

Klonierung und regulierbare Expression des löslichen VEGF- Rezeptors sFlt-1 in vitro

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Eva Senger
aus Frankfurt/Oder

Gießen 2015

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen
(Direktorin: Prof. Dr. med. Birgit Lorenz)

Gutachter: Prof. Dr. Dr. K.Stieger

Gutachter: Prof. Dr. K.-D.Schlüter

Tag der Disputation: 09.11.2015

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Angiogenese | 1 |
| 1.2 | Physiologische Angiogenese in der Retina | 2 |
| 1.2.1 | Neovaskularisation | 3 |
| 1.3 | Proliferative Retinopathien | 4 |
| 1.3.1 | Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) | 4 |
| 1.3.2 | Diabetische Retinopathie | 5 |
| 1.3.3 | Frühgeborenenretinopathie (Retinopathia praematurorum, ROP) | 5 |
| 1.3.4 | Klassische Behandlungsmethoden der Retinopathie..... | 6 |
| 1.4 | VEGF (Vascular endothelial growth factor) | 7 |
| 1.4.1 | Entdeckung und Bedeutung von VEGF | 7 |
| 1.4.2 | VEGF: Aufbau und Isoformen..... | 8 |
| 1.4.3 | VEGF-Rezeptoren | 9 |
| 1.5 | Ein neuer pharmakologischer Ansatz: Antiangiogene Faktoren | 10 |
| 1.5.1 | Pegaptanib (Macugen ®) | 11 |
| 1.5.2 | Bevacizumab (Avastin ®) | 12 |
| 1.5.3 | Ranibizumab (Lucentis ®) | 13 |
| 1.5.4 | Aflibercept (Eylea®)..... | 14 |
| 1.5.5 | Vergleich..... | 15 |
| 1.6 | Physiologisches Anti-VEGF- Molekül sFlt-1 | 16 |
| 1.6.1 | Physiologische Funktion | 16 |
| 1.6.2 | Spliceformen..... | 16 |
| 1.6.3 | Pathologische Auswirkung..... | 17 |
| 1.7 | Transgene Expression von sFLT-1 als therapeutisches Agens..... | 18 |
| 1.7.1 | Kontinuierliche Expression von sFlt-1 | 18 |
| 1.7.2 | Regulierbare Expression von sFlt-1 | 21 |

| | | |
|-------|--|----|
| 1.8 | Ziel der Arbeit | 24 |
| 2 | Material | 25 |
| 2.1 | Chemikalien | 25 |
| 2.2 | Puffer..... | 25 |
| 2.3 | PCR-Primer | 28 |
| 2.4 | Reagenzien und Kits | 29 |
| 2.5 | Enzyme | 29 |
| 2.6 | DNA-und Protein-Größenstandards | 30 |
| 2.7 | Antikörper..... | 30 |
| 2.8 | Rekombinantes sFlt-1 | 31 |
| 2.9 | Röntgenfilme und Membranen | 31 |
| 2.10 | Immunoassay | 31 |
| 2.11 | Vektoren und Plasmide | 31 |
| 2.12 | Zelllinien | 35 |
| 2.13 | E.coli-Stämme | 36 |
| 2.14 | Geräte | 36 |
| 3 | Methoden | 38 |
| 3.1 | DNA-Herstellung | 38 |
| 3.1.1 | RT-PCR: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion..... | 38 |
| 3.1.2 | Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 39 |
| 3.2 | Klonierung | 40 |
| 3.2.1 | Isolierung von Plasmid-DNA | 42 |
| 3.2.2 | Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration | 42 |
| 3.2.3 | Enzymatische Hydrolyse (Restriktion) | 43 |
| 3.2.4 | Agarosegelelektrophorese | 43 |
| 3.2.5 | DNA-Extraktion aus Agarosegel | 43 |
| 3.2.6 | Dephosphorylieren von DNA | 44 |
| 3.2.7 | Ligation mit der T4-DNA Ligase..... | 44 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.2.8 | Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen | 44 |
| 3.2.9 | Transformation elektrokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen | 45 |
| 3.2.10 | DNA-Sequenzierung..... | 45 |
| 3.2.11 | Anlegen von Glycerin-Stocks..... | 45 |
| 3.3 | Zellbiologische Methoden..... | 46 |
| 3.3.1 | Zellkultur | 46 |
| 3.3.2 | Kryokonservierung von Zellen | 46 |
| 3.3.3 | Auftauen von Zellen..... | 46 |
| 3.3.4 | Auszählen von Zellen | 46 |
| 3.3.5 | Transfektion | 47 |
| 3.3.6 | Lipofektion | 47 |
| 3.3.7 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 48 |
| 3.3.8 | Coomassie-Färbung | 49 |
| 3.4 | Western-Blot | 49 |
| 3.4.1 | Ponceau Rot-Färbung | 49 |
| 3.4.2 | Detektion mit Antikörpern | 50 |
| 3.4.3 | Immundetektion mit anti-HIS tag Antikörper | 50 |
| 3.5 | HUVEC Migrationsassay | 51 |
| 3.6 | Statistische Auswertung des HUVEC Migrationsassay | 51 |
| 4 | Ergebnisse | 52 |
| 4.1 | Auswahl der verschiedenen Isoformen von sFLT-1 (NCBI) | 52 |
| 4.2 | Design Primer für sFlt-1 | 52 |
| 4.3 | RT-PCR..... | 53 |
| 4.4 | Klonierung | 53 |
| 4.4.1 | Zweiteilige Klonierung von sFlt-1 in pCR2.1 Topo..... | 53 |
| 4.4.2 | Fusion der beiden Teile (3' und 5')..... | 53 |
| 4.4.3 | Klonierung von sFlt-1 in pIRES-hrGFP1a..... | 55 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.4.4 | Klonierung von sFLt-1 in pcDNA.3 (+) und Hinzufügen eines His Tag | 55 |
| 4.4.5 | Klonierung in SSV9 reguliert..... | 58 |
| 4.5 | In Vitro Expression von sFLt-1 | 60 |
| 4.6 | Western-Blot mit his-getagtem sFLt-1 | 60 |
| 4.7 | Huvec Migrationsassay | 62 |
| 5 | Diskussion..... | 66 |
| 5.1 | Charakteristik von sFLt-1..... | 67 |
| 5.2 | Vergleich mit aktuellen therapeutischen Molekülen..... | 67 |
| 5.3 | Ein regulierbares Expressionssystem-TetOn | 69 |
| 5.4 | Ausblick..... | 70 |
| 6 | Zusammenfassung | 71 |
| 7 | Summary..... | 72 |
| 8 | Anhang..... | 73 |
| 8.1 | Abkürzungsverzeichnis | 73 |
| 8.2 | Abbildungsverzeichnis..... | 78 |
| 8.3 | Tabellenverzeichnis..... | 79 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 80 |
| 10 | Publikationsverzeichnis..... | 89 |
| 11 | Erklärung zur Dissertation..... | 90 |
| 12 | Danksagung..... | 91 |

1 Einleitung

1.1 Angiogenese

Der Begriff der Angiogenese wurde erstmals 1787 von dem Chirurgen Dr. John Hunter verwendet, um die Bildung neuer Blutgefäße in Rentier-Geweihen zu beschreiben. Seither wird das Wachstum von kleinen Blutgefäßen (Kapillaren), welches überwiegend durch Sprossung aus einem zuvor gebildeten Kapillarsystem entsteht, als Angiogenese bezeichnet. Man unterscheidet drei Formen der Blutgefäßneubildung: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese. Die Vaskulogenese ist besonders in der Embryonalentwicklung von besonderer Bedeutung, da sich hier ein vorläufiges Gefäßnetzwerk aus zirkulierenden Stammzellen bildet, die sich in situ zu Angioblasten differenzieren (Risau et al. 1995). Bei der Angiogenese formen sich Gefäße aus bereits vorhandenen Strukturen um verletztes oder krankes Gewebe besser zu durchbluten. Man unterscheidet zwei Hauptarten der Angiogenese. Zum einen existiert die Intussuszeption, bei der sich in einem Blutgefäß transendotheliale Zellbrücken bilden, die nachfolgend durch Gewebebrücken verstärkt werden und so in das Gefäßlumen wachsen. Auf diese Weise entstehen durch Invagination zwei Tochtergefäße (Patan et al. 1992). Zum anderen werden aus verletzten oder kranken Geweben angiogene Wachstumsfaktoren wie etwa VEGF (vascular endothelial growth factor) freigesetzt, die ins umliegende Gewebe diffundieren und an die spezifischen Rezeptoren der dort bereits vorhandenen Blutgefäße binden. Infolgedessen werden die Endothelzellen der Blutgefäße aktiviert, sie setzen Enzyme frei, die die Gefäßpermeabilität erhöhen. Hierdurch können die Endothelzellen, vor allem durch VEGF gelockt, gerichtet durch die aufgelockerte Membran migrieren. VEGF bindet am Endothel an seine Rezeptoren VEGF-R1, VEGF-R2 und VEGF-R3. Zusätzlich werden Faktoren wie TGF- β 1 oder PDGF-B freigesetzt um auch glatte Muskelzellen, die für den Gefäßneubau wichtig sind, zu rekrutieren (Hirschi et al. 1998). Der neue Gefäßspross findet den Weg in erster Linie durch die an der Spitze liegenden „tip cells“; die Endothelzellen bilden Filopodien aus, durch die sie migrieren können (Gerhardt und Betsholtz 2003). Gleichzeitig werden zusätzliche Enzyme, wie die Matrix-Metalloproteinasen freigesetzt, die durch Proteolyse den Weg für den Gefäßspross ins Interstitium bereiten. Die einzelnen Gefäßsprosse anastomosieren, werden durch glatte Muskelzellen stabilisiert und somit wird das bisher nicht durchblutete Gewebe versorgt (Folkman und D'Amore 1996).

Physiologisch soll dieser Mechanismus der neuen Gefäßbildung nur im Verlauf der Wundheilung und während des Reproduktionszyklus der Frau vorkommen. Als pathologischer Vorgang ist die Angiogenese aber auch Grundlage für Prozesse wie Tumorwachstum und Metastasierung, rheumatoide Arthritis und zu einem großen Teil auch bei proliferativen Netzhauterkrankungen im Auge. Unter diesen Umständen fördern neue Blutgefäße das Wachstum krankhafter Gewebe, zerstören das gesunde Gewebe und ermöglichen Tumorzellen den Einbruch in den Blutkreislauf und damit die Streuung in andere Organe. Der bedeutendste Stimulus für die Initiierung der Angiogenese ist die Hypoxie in den entsprechenden Geweben. Durch das mangelnde Sauerstoffangebot werden Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 exprimiert, die dafür sorgen, dass proangiogene Faktoren wie z.B. VEGF in minderversorgten oder proliferativen Geweben freigesetzt werden (Rehn et al. 2011; Coulon et al. 2010). HIF-1 setzt sich aus zwei Einheiten zusammen, die alpha-Untereinheit liegt inaktiv im Zytosol vor, während die beta-Untereinheit inaktiv im Zellkern vorliegt (Semenza et al. 2000). Durch den Beginn der Hypoxie wird HIF-1 α in den Zellkern transportiert und bildet dort zusammen mit HIF-1 β funktionell aktive Heterodimere, die zu einer erhöhten VEGF-Expression führen (Friling et al. 1996). Solange keine ausreichende Sauerstoffversorgung im entsprechenden Gebiet vorliegt wird der Abbau von HIF-1 α verhindert. Erst bei ausreichender Sauerstoffversorgung und demnach vermindertem Bedarf an VEGF wird der HIF-1 α -Abbau gesteigert. Bereits 30 Minuten später ist es nicht mehr im Kern nachweisbar (Jewell und Gassmann 2001). Da die Einsprossung der Gefäße in retinales Gewebe letztendlich durch lokale Hypoxie und Überexpression proangiogener Faktoren wie VEGF verursacht wird, zielt die Entwicklung von Therapien am Auge auf die Hemmung der Gefäßneubildung durch Hemmung der VEGF-Aktivität ab.

1.2 Physiologische Angiogenese in der Retina

Die Retina entsteht ab der 6. Schwangerschaftswoche (SSW) während der Embryogenese aus einer Diencephalonausstülpung (Hughes et al. 2000). Erst ab der 14. SSW beginnt die Gefäßentwicklung in mehreren Angio- und Vaskulogeneseschritten (Fruttiger et al. 2002). Zunächst migrieren mesenchymale, spindelförmige Vorläuferzellen von der Papille aus in Richtung Peripherie. Innerhalb einer Woche differenzieren sie sich zu Endothelzellen. Astrozytenzellen schütten lokal VEGF-A aus, durch welches die Endothelzellen in ihrer Zellteilungsaktivität und Wachstumsrichtung beeinflusst werden (Fruttiger et al. 2007). Somit entsteht um die

Papille ein oberflächliches, einfaches Gefäßnetzwerk. Angio- und Vaskulogenese verlaufen zwischen der 15. und 20. SSW parallel. Die Vaskulogenese wird bis zur 21. SSW abgeschlossen. Das äußere Netz des retinalen Gefäßsystems sowie der peripapilläre Plexus entstehen während der Angiogenese aus dem inneren Plexus. Dieser Prozess wird ab der 21. SSW durch Hypoxie und die damit verbundene Sekretion von VEGF stimuliert. Bei der Geburt ist die Gefäßentwicklung bis zum Rand der Netzhaut abgeschlossen.

1.2.1 Neovaskularisation

Intraokulare Neovaskularisation tritt pathologisch bei verschiedenen Augenerkrankungen auf. In klinischen Experimenten wurde nachgewiesen, dass sowohl die Retina als auch der Glaskörper potentielle Quellen für die Produktion von pro- und antiangiogenen Faktoren sind (Glaser et al. 1980). Grundsätzlich können alle Bereiche des Auges von der Neovaskularisation betroffen sein, bei Beteiligung der Netzhaut sind die Schäden jedoch am Größten. Durch Glaskörperblutung, Glaukombildung und auch Netzhautablösung führt sie zu einer folgeschweren Beeinträchtigung der Sehkraft (Patz et al. 1980). Die Struktur der Retina ermöglicht die Identifizierung zweier Neovaskularisationstypen: der retinalen Neovaskularisation, bei der neue Sprosse retinaler Gefäße in den Glaskörper wachsen und der choroidalen Neovaskularisation (CNV), bei der Sprosse die Bruch'sche Membran penetrieren und in den subretinalen Spalt einwachsen. Ischämie und Hypoxie spielen eine zentrale Rolle für die Entstehung der retinalen Neovaskularisation (Michaelson et al. 1948). Die Ischämie entsteht häufig durch einen Verschluss der retinalen Gefäße, vor allem bei der Diabetischen Retinopathie und der Retinopathia prematurorum. (Campochiaro et al. 2000). Durch die Hypoxie werden überwiegend proangiogene Faktoren wie VEGF freigesetzt, es kommt zum „angiogenic switch“ (Ribatti et al. 2007). Dieser Begriff stammt ursprünglich aus der Tumorforschung. „Angiogenic switch“ beschreibt die Verschiebung des zunächst herrschenden Gleichgewichts zwischen Inhibitoren und Aktivatoren während der „Tumor Dormancy“, der sogenannten Tumor-Ruhephase. Benötigt der Tumor für sein Wachstum eine eigene Blutversorgung, kommt es zum angiogenic switch, es werden durch genetische Veränderungen in den Tumorzellen mehr proangiogene Faktoren ausgeschüttet (Moserle et al. 2009). Es kommt dennoch nicht ausschließlich zur Neubildung von Blutgefäßen, auch eine abnorme, angiogene Reaktion mit Hämorrhagien und Leckagen kann vorkommen (Adamis et al. 1994).

1.3 Proliferative Retinopathien

1.3.1 Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Eine der führenden Ursachen für die Erblindung von Menschen über dem 50. Lebensjahr in Industrieländern ist die AMD (Jager et al. 2008). Als größter Risikofaktor für die Entwicklung der AMD wird vor allem das Rauchen gesehen, zusätzlich tragen hoher Blutdruck und bestimmte Allele in *CFH*, *C3* und *ARMS2* zu der Entstehung, nicht jedoch zum Fortschreiten der AMD bei (Thornton et al. 2005; Scholl et al. 2009). Es werden zwei Formen unterschieden: die häufigere, trockene und langsam fortschreitende Makuladegeneration und die feuchte, dramatisch verlaufende Form. Die trockene Form weist RPE-Defekte auf und kann in die feuchte Form übergehen, bei der choroidale Neovaskularisationen unter die Retina wachsen (Pagliarini et al. 1995). Die Patienten bemerken zunächst eine Abnahme der Sehschärfe und somit der Lesefähigkeit, eine Schwäche im Farb- und Kontrastsehen sowie eine erhöhte Lichtempfindlichkeit und Schwierigkeiten sich an veränderte Lichtverhältnisse anzupassen. Über fixierten Gegenständen liegt oft ein grauer Schatten. Ursache dafür ist die Anreicherung von Stoffwechselprodukten in der Retina. In den Lysosomen der Retina lagert sich Lipofuszin ab, zusammen mit weiteren Endprodukten bilden sich Drusen zwischen Bruchscher Membran und RPE (Grunwald et al. 1998). Da eine ausreichende Nährstoffversorgung nicht mehr gewährleistet ist, sterben Pigmentepithelzellen ab und hinterlassen Zwischenräume in der Bruch'schen Membran, in die vermehrt Gefäße aus der Choroidea einwachsen (Holz et al. 2004). Bei der Wahl der Therapie kommt es darauf an, welche Form der AMD vorliegt. Die Gefahr des Sehverlustes bei der feuchten Form ist größer, daher muss die Therapie schnell erfolgen. Die Gefäße werden mit einem Laser koaguliert, nicht jedoch bei Lokalisation in unmittelbarer Nähe der Fovea. Ist das Gefäßwachstum bereits zu weit fortgeschritten, kann eine Phototherapie mit Verteporfin (Visudyne®) angewendet werden (Lai et al. 2002). Um den Nährstoffmangel auszugleichen und den Verlauf der trockenen AMD zu bremsen werden hochdosierte Vitaminpräparate verordnet. Die Anti-VEGF-Therapie mit Ranibizumab ist in der EU seit 2007 zugelassen, ebenso die kostengünstigere Off-Label-Behandlung mit Bevacizumab (Subramanian et al. 2010).

1.3.2 Diabetische Retinopathie

Etwa ein Drittel der deutschen Diabetiker leiden an einer diabetischen Retinopathie. Nach 25 Jahren mit Diabetes mellitus beträgt das Risiko für die Entstehung einer Retinopathie ca. 50%. Die Patienten berichten über einen zentralen Visusverlust und eine Verringerung des peripheren Gesichtsfeldes. Die Accord-Studie, die 10.251 Patienten nach 4 Jahren kontrolliert hat, zeigt, dass eine intensive Therapie wichtiger Risikofaktoren wie einem erhöhten Blutzucker- oder Blutfettspiegel das Fortschreiten der Diabetischen Retinopathie deutlich verringern kann (Chew et al. 2010).

Man unterteilt die diabetische Retinopathie in die Formen proliferativ und nonproliferativ. Die Übergänge sind fließend. Die nonproliferative Retinopathie ist auf die Retina beschränkt, es kommt zu Mikroaneurysmen der Arterien und Blutungen innerhalb der Retina sowie Ödemen. Bei der proliferativen Form, die etwa 20% der Diabetiker entwickeln, kommt es zusätzlich zu extraretinalen Komplikationen wie Glaskörperblutungen, Netzhautablösungen, Gefäßneubildungen vor der Retina oder auf der Regenbogenhaut (Rubeosis iridis). Generelle Ursache ist die Hyperglykämie, durch die verstärkt das Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf den Endothelzellen exprimiert wird, anschließend lagern sich Leukozyten in den Kapillaren zusammen, und führen durch den Verschluss der Kapillare zu einer lokalen Hypoxie. Nach einiger Zeit stimuliert die Ischämie die Bildung von VEGF, so dass es zu Neovaskularisationen und Gefäßleckagen kommt (Joussen et al. 2001). Eine weitere Ursache ist der Verlust von Perizyten. Ferner kommt es durch fibrovaskuläre Sprossung zu Netzhautablösungen (Stefansson et al. 2004). Die Injektion von VEGF-Hemmern stellt bislang die erfolversprechendste Therapie dar (Hammes et al. 2011).

1.3.3 Frühgeborenenretinopathie (Retinopathia praematurorum, ROP)

Die Frühgeborenenretinopathie (ROP) ist einer der drei häufigsten Gründe für die Erblindung von Kindern (Oberacher-Velten und Helbig 2010). Es treten etwa 500 neue Fälle pro Jahr auf (Harrell und Brandon 2007). Als wichtigste Risikofaktoren für die Entwicklung einer ROP gelten eine inadäquate Sauerstofftherapie bei Frühgeborenen, Anämie mit benötigter Bluttransfusion, Sepsis und Apnoe (Chawla et al. 2010). Wird ein Kind zu früh geboren, ist die Blutgefäßbildung in der Netzhaut, vor allem peripher, noch nicht abgeschlossen. Sofern Frühgeborene mit Sauerstoff beatmet werden, liegt meist eine unphysiologische Hyperoxie vor, die zur Bildung von gefährlichen Sauerstoffradikalen, aber auch zur Hemmung der VEGF und EPO- Produktion führen

kann. Primär kommt es zur Vasokonstriktion. Bleibt der Sauerstoffpartialdruck erhöht kommt es zum Gefäßverschluss. Wird das Kind nach Ausbildung der Lungenreife nicht mehr beatmet, kommt es im Gewebe zum Wechsel von einer Hyper- zur Hypoxie, die der Körper mit einer überschießenden VEGF Produktion auszugleichen versucht. Somit besteht die Gefahr der Neovaskularisation in den Glaskörper hinein. Ist der Zug an der Netzhaut zu stark kann es zu einer Ablösung kommen. Daher sollte die Beatmung sparsam und gut überwacht stattfinden (Quinn et al. 2010). Alle behandelten Frühgeborenen werden heutzutage jedoch einem engmaschigen Screening unterzogen um frühzeitig auf Komplikationen aufmerksam zu werden. (Jandeck et al. 2008). Für Kinder die vor der 32. Schwangerschaftswoche geboren werden oder ein Geburtsgewicht < 1500g haben, sollte das erste Screening 1 Monat nach der Geburt erfolgen.

Je nach Lage und Stadium der ROP sollten weitere Untersuchungen geplant werden, ab Stadium 3 besteht Therapiebedarf, da es zur Netzhautablösung kommen kann. Je früher behandelt wird, desto besser ist das Outcome. Die klassische Behandlungsmethode ist die Ablation mit Laser unter Analgesie und Sedierung (Chawla et al. 2010). Die experimentelle Gabe von intraokularen anti-VEGF Gaben wird momentan verstärkt untersucht.

1.3.4 Klassische Behandlungsmethoden der Retinopathie

Eine klassische Behandlungsmethode der Retinopathie ist die photodynamische Therapie. Hierbei wird ein Porphyrin-Farbstoff (Verteporfin) intravenös gespritzt und im Gefäßendothel angereichert, wo er zusammen mit LDL Komplexe bildet. Nach zehnminütiger Infusion wird der Patient mit nicht-thermischem rotem Licht einer bestimmten Wellenlänge über 80 Sekunden bestrahlt. Durch das Licht werden reaktive Sauerstoffabkömmlinge gebildet; sie verschließen die neugebildeten Blutgefäße. Umliegendes Gewebe wird nicht geschädigt.

Lange Zeit wurde die Laserkoagulation mit einem Argon- oder Grünlaser als einzig nützliche Therapieoption gesehen (Shiraga et al. 1998). Hierbei unterscheidet man die panretinale von der fokalen Lasertherapie. Bei der panretinalen Methode wird eine Vernarbung durch den Laser um die Makula herum induziert. Der Sauerstoffbedarf der vernarbten Areale sinkt, so kann die Makula besser versorgt werden. Bei der fokalen Lasertherapie hingegen werden mit dem Laser undichte Gefäßneubildungen vernarbt, die für ein Makulaödem zuständig sind (Grehn 2008). Ein klarer Vorteil dieser Methode

ist, dass durch die Zerstörung der ischämischen Areale keine neuen angiogenen Faktoren gebildet werden.

Eine weitere Methode um eine Netzhautablösung zu verhindern ist die Vitrektomie. In einer Studie von Ratnarajan wurde die Entfernung des Glaskörpers und möglicher Membranen mit der Laserbehandlung von Hämorrhagien verglichen, beide Methoden führten zum Stillstand der proliferativen Retinopathie (Ratnarajan et al. 2011).

1.4 VEGF (Vascular endothelial growth factor)

1.4.1 Entdeckung und Bedeutung von VEGF

VEGF ist einer der wichtigsten bekannten Angiogenesefaktoren. 1948 stellte Michaelson die Hypothese auf, dass ein diffusionsfähiger, angiogener "Faktor X", der in Retinazellen produziert wird, für die Neubildung von Gefäßen in der Iris und Retina bei der proliferativen diabetischen Retinopathie verantwortlich sei (Michaelson et al. 1948). 1970 isolierte Judah Folkman aus Tumorgewebe einen Wachstumsfaktor, dem er die Fähigkeit zuschrieb für die Gefäßneubildung verantwortlich zu sein. Viele Ansätze der heutigen Tumorthherapie beruhen auf seinem Gedanken, diesen Wachstumsfaktor zu inhibieren und somit Tumorwachstum limitieren zu können. 1983 wurde erstmals der Vascular Permeability Factor (VPF) durch 2 separate Forschergruppen von Harold Dvorak und Donald Senger isoliert und für die Durchlässigkeit von Gefäßen verantwortlich gemacht (Senger et al. 1983). Die Arbeitsgruppe von Napoleone Ferrara isolierte 1989 ein nur endothelspezifisch mitogen wirksames Protein und nannte es dementsprechend VEGF, nach späteren Tests stellte sich heraus, dass es dem VPF entspricht (Ferrara und Henzel 1989). Drei Jahre später stellten sowohl die Forschergruppen von Keshet als auch von Plate unabhängig voneinander fest, dass die VEGF-Expression in besonders ischämischen Tumorgebieten am höchsten ist und somit Hypoxie einen Schlüsselreiz für die Angiogenese darstellt (Shweiki et al. 1992; Plate et al. 1992). Zeitgleich wurden zwei Tyrosinkinase-Rezeptoren für VEGF identifiziert, VEGFR-1 (Flt-1) von de VRIES, und VEGFR2 (Flk-1/KDR) durch Terman (Vries et al. 1992; Terman et al. 1992).

Ferrara demonstrierte die Notwendigkeit von VEGF für die normale embryonale Entwicklung in einem Knockout-Mausmodell, in dem die Ausschaltung eines einzigen VEGF-Allels die embryonale Letalität zwischen Tag 11 und 12 deutlich verstärkte (Ferrara et al. 1996).

1.4.2 VEGF: Aufbau und Isoformen

In vivo induziert VEGF mikrovaskuläre Durchlässigkeit und spielt eine zentrale Rolle in der Angio- und Vaskulogenese. Das VEGF-Gen ist auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert (Vincenti et al. 1996). Durch alternatives Splicen der mRNA entstehen verschiedene Isoformen von VEGF, die sich sowohl in ihrem Expressionsmuster als auch in ihrer biologischen und biochemischen Funktion unterscheiden. Alle VEGF-Isoformen sind kovalent gebundene Homodimere. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Der Unterschied liegt in der Länge der Polypeptidkette, die durch An- oder Abwesenheit von Sequenzen, kodiert durch Exon 6 und 7, variieren (Tischer et al. 1991). Die VEGF-A Isoformen werden nach der Anzahl ihrer Aminosäuren eingeteilt in VEGF-A_{121,138,145,148,162,165b,183,189,206} (Tabelle 1) (Leung et al. 1989; Houck et al. 1991; Poltorak et al. 1997; Lei et al. 1998; Cebe Suarez et al. 2006).

| | Isoformen | Interaktion | Funktion |
|---------------|---|---|--|
| VEGF A | (121),(138), (145),(148),(162), (165),(183),(206) | VEGFR-1 VEGFR-2, ADAMTS1, CTGF, NRP-1 | Fördert Angiogenese, Chemotaxis für Makrophagen und Granulozyten, Vasodilatation durch NO Freisetzung |
| VEGF B | (167) , (186) | VEGFR-1 NRP-1 | Erhaltung neugebildeter Gefäße durch positiven Effekt auf Perizyten, vaskuläre Stamm- und Progenitorzellen |
| VEGF C | | VEGFR-2 VEGFR-3 | Lymphangiogenese |
| VEGF D | | VEGFR-2 VEGFR-3 | Entwicklung lymphatische Gefäßstrukturen um Bronchiolen |
| PGF | PlGF1 PlGF2 PlGF3 | VEGFR-1 NRP-1 NRP-2 | Angulo- und Vaskulogenese während Embryogenese |

Tabelle 1: VEGF Isoformen (Luque 2003, Inoki 2002, Mamluk 2002, Huusko 2010, Zhang 2009, Olofsson 1998, Makinen 1999, Chaudary 2011, Achen 1998, Luttun 2002 uniprot.org)

1.4.3 VEGF-Rezeptoren

Durch das Binden an verschiedene Rezeptoren reguliert VEGF die Gefäß- und Lymphentwicklung. Bis heute sind drei membranständige Rezeptortypen bekannt:

VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. Ein weiterer Rezeptor ist die lösliche Form von VEGFR-1: das sFLT-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) (Kendall und Thomas 1993). Die membranständigen Rezeptoren sind Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Sie setzen sich zusammen aus einem extrazellulären Teil mit sieben Immunglobulin-artigen Domänen, einer Transmembranregion und einem Zytoplasma-Anteil, der über Tyrosin-Kinase-Aktivität verfügt. Sobald ein VEGF-Dimer an einen Rezeptor bindet, wird ein zweiter Rezeptor zur Dimerbildung hinzugezogen, so dass sich die Tyrosinkinasen gegenseitig phosphorylieren. Die Signalkaskade wird anschließend durch Disulfidbrücken-tragende Signalproteine ausgelöst, die an die phosphorylierten Bereiche binden. Dadurch werden weitere Faktoren aktiviert und es kommt zur Gefäßproliferation (Olsson et al. 2006).

VEGFR-1 wird für die Rekrutierung von hämatopoetischen Stammzellen und die Migration von Monozyten und Makrophagen benötigt. VEGFR-2 ist vor Allem auf Endothelzellen zu finden, während VEGFR-3 vorrangig für die Regulierung des Lymphgefäßsystems zuständig ist (Holmes et al. 2007). Besonders hohe Spiegel des löslichen Rezeptors sFlt-1 findet man in der Plazenta während verschiedener Schwangerschaftsstadien (Clark et al. 1998).

VEGFR-1 (Flt-1) ist ein ~180kDa großes Glykoprotein und war der erste identifizierte VEGF-Rezeptor (Shibuya et al. 1990). An diesen Rezeptor binden die VEGF-Isoformen A, B und PlGF (siehe Abb 1). Er ist essentiell für die Vaskulogenese: Mäuse ohne VEGFR-1 sterben am 8.5 Tag der Embryonalentwicklung (Fong et al. 1995).

VEGFR-2, auch bekannt als kinase-insert-domain-containing-Rezeptor (KDR, Flk-1), ist etwa 200-230 kDa groß und bindet mit hoher Affinität VEGF-A sowie an VEGF-C,D (siehe Abb. 1) (Quinn et al. 1993; Waltenberger et al. 1994). Mäuse, bei denen VEGFR-2 ausgeschaltet wurde, sterben am 9,5 Tag der Embryonalentwicklung (Shalaby et al. 1995).

VEGFR-3 (Flt-4) ist vor allem auf Lymphgefäßen zu finden und bindet VEGF-C und D (Pajusola et al. 1992; Finnerty et al. 1993; Kaipainen et al. 1995).

sFlt-1 enthält nur die ersten sechs Ig-like Domänen von VEGFR-1, liegt dadurch löslich vor und kann somit dorthin diffundieren, wo es benötigt wird. Es bindet VEGF genauso

stark wie der membranständige Rezeptor VEGFR-1 (siehe Kapitel 1.6) (Zuluaga et al. 2007).

Weiterhin sind bis jetzt zwei Co-Rezeptoren von VEGF bekannt: Neurolipin 1 und 2. Sie gehören ursprünglich in die Gruppe der Semaphorine/Collapsin-Rezeptoren, modulieren aber die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren. Erst bei Co-Expression mit z.B. VEGFR-2 bindet VEGF₁₆₅. Kann VEGF nicht an NRP-1 binden, wird somit auch die VEGFR-2 Bindung inhibiert und dadurch die mitogene Aktivität verringert (Soker et al. 1998).

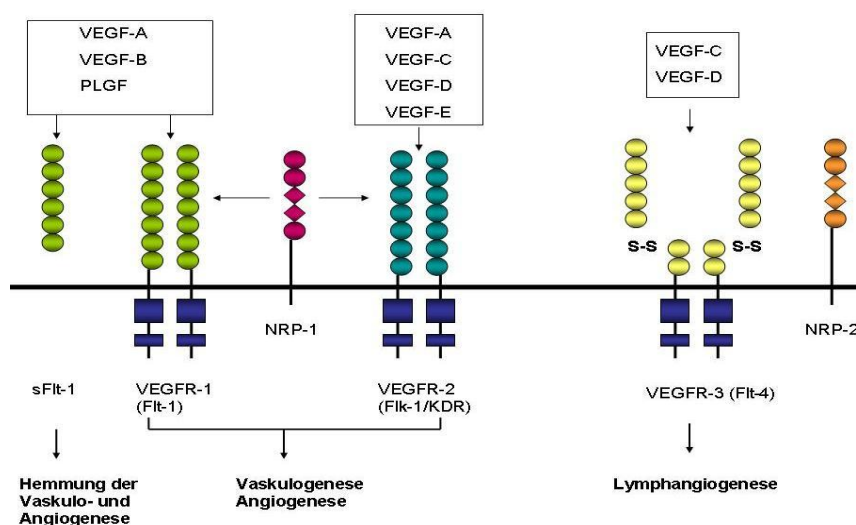


Abbildung 1: Schema der VEGF Rezeptoren und ihrer Liganden (modifiziert nach Hicklin DJ, Ellis LM. J Clin Oncol. 2005;23:1011-1027)

1.5 Ein neuer pharmakologischer Ansatz: Antiangiogene Faktoren

Seit die Bedeutung und Kenntnis von VEGF in den Fünziger Jahren immer größer wurde wurden vorrangig Therapieoptionen mit dem Angriffspunkt VEGF entwickelt. Mit der Isolierung von VEGF aus Tumorgewebe wuchs die Idee, dass die Hemmung dieses Wachstumsfaktors alles weitere Gefäßwachstum stoppen könnte, da Gefäßproliferation meist mit erhöhten VEGF- Spiegeln einhergeht (Folkman et al. 1971). Auf diesem Grundsatz basiert die heutige Anti-VEGF-Therapie, sei es in der Onkologie, der Kardiologie oder der Ophthalmologie. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten: entweder man hindert VEGF an der Bindung zum Rezeptor, indem man

es zuvor abfängt oder der Rezeptor wird blockiert (Ferrara und Kerbel 2005). Nachfolgend werden die bisher klinisch angewendeten Medikamente näher beschrieben, die eine Bindung von VEGF an den Rezeptor verhindern.

1.5.1 Pegaptanib (Macugen ®)

Im Dezember 2004 erhielt Pegaptanib (Macugen ®) als erstes Anti-VEGF-Medikament in den USA seine Zulassung, 2006 dann auch in der EU. Pegaptanib ist ein Aptamer (= einzelner Nukleinsäurestrang) aus 28 Ribonukleinsäuren das selektiv und hochaffin die VEGF-A-Isoform (VEGF-A₁₆₅) bindet (Gragoudas et al. 2004). Pegaptanib bindet über sein Uracil 14 an das Cystein₁₃₇ der 55 AS-Heparinbindestelle von VEGF₁₆₅ (siehe Abb. 2). Durch diese Bindung kann die choroidale Neovaskularisation gehemmt werden. Nach einer intravitrealen Injektion von 0,5 mg mit einer Halbwertszeit von ca. 94 h konnten nach 28 Tagen noch immer ausreichend biologisch aktive Pegaptanib-Moleküle im Glaskörper nachgewiesen werden. (Drolet et al. 2000).

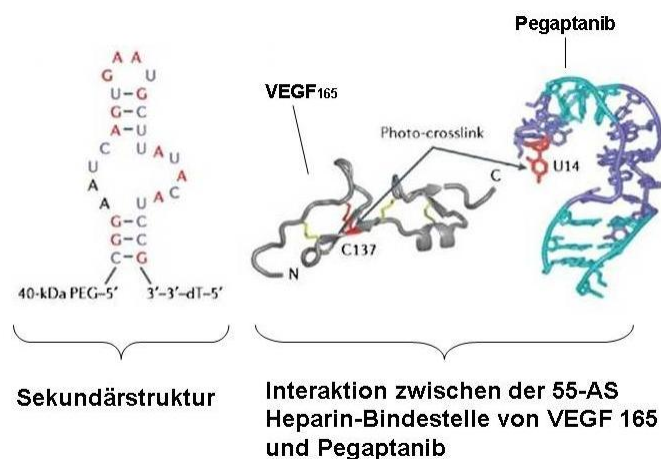


Abbildung 2: Der molekulare Aufbau des Aptamers Pegaptanib (modifiziert nach: Ng EW 2006)

Mit der „V.I.S.I.O.N.“- Studie (VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularisation) wurde 3 Jahre lang die Qualifizierung von Pegaptanib für die Anwendung bei Patienten mit AMD geprüft. Alle Patienten (eingeteilt in 4 Gruppen) erhielten im Abstand von 6 Wochen eine intravitreale Injektion in unterschiedlichen Dosierungen sowie eine Placeboinjektion. Nach einem Jahr zeigte sich, dass eine höhere Dosierung keinen

weiteren Erfolg brachte. Hingegen hatten die Patienten der Pegaptanibgruppe weniger Visusverlust zu verzeichnen (30%) als die Kontrollgruppe (45%). Es kam zu keinen nennenswerten Auffälligkeiten, Nebenwirkungen traten nur mild auf und waren meist injektionsbedingt (Singerman et al. 2008). Die Dosierung liegt nach EMEA Angaben bei 0,3 mg Macugen® intravitreal unter adäquater Anästhesie injiziert alle 6 Wochen.

1.5.2 Bevacizumab (Avastin ®)

Bevacizumab (Avastin ®) ist ein humanisierter monoklonaler Maus IgG1-Antikörper mit einem Molekulargewicht von 149 kDa der sich gegen alle VEGF-A Isoformen richtet (siehe Abb.3). Er wird mittels DNA-Technologie aus CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) gewonnen. Der Antikörper Bevacizumab enthält 7% murine und 93% humane Sequenzen. Durch das Verhindern der Bindung von VEGF an seine Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen wird die Rezeptor-Tyrosin-Kinase nicht aktiviert und die darauf folgende Signaltransduktion unterbleibt. Somit wird die Tumorprogression gehemmt und die mikrovaskuläre Permeabilität reduziert (Hurwitz et al. 2004). Bevacizumab wurde 2004 in den USA von der FDA für die Behandlung von Patienten mit Colon- und Rektum Karzinomen zugelassen. Die Behandlung von Augenerkrankungen ist nur im off-label Gebrauch gestattet, dennoch wird Bevacizumab nicht nur für die feuchte AMD sondern auch für unterschiedlichste Augenerkrankungen, die mit einem Makulaödem oder vermehrtem Blutgefäßwachstum assoziiert sind, verwendet (Meyer und Holz 2011).

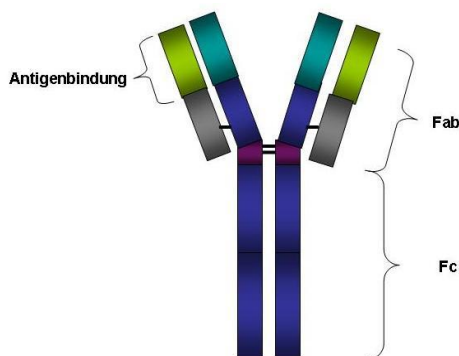


Abbildung 3: Der molekulare Aufbau von Bevacizumab

In der ABC Studie 2010 wurde an 131 Patienten die Injektion von 1,25 mg Bevacizumab (6-wöchentlich) verglichen mit der Standardbehandlung Phototherapie + Verteporfin, der Injektion von bpegaptanib sowie einer Scheininjektion. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Behandlung mit Bevacizumab den restlichen Behandlungsmethoden überlegen ist. Außerdem gab es keine schwerwiegenden Nebenwirkungen (Tufail et al. 2010).

1.5.3 Ranibizumab (Lucentis ®)

Ranibizumab ist das zweite, seit 2007, zugelassene Anti-VEGF-Medikament. Es handelt sich hierbei um ein in *Eschericia coli* synthetisch hergestelltes, monoklonales Antikörperfragment F(ab) Fragment des IgG1 Antikörpers Bevacizumab. Mit hoher Affinität werden von ihm alle VEGF-A Isoformen gebunden und somit die Bindung von VEGF-A an seine Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 verhindert. Ranibizumab ist nach Injektion systemisch nachweisbar, die Halbwertszeit beträgt im Serum allerdings wenige Stunden. Der Serumspiegel (Cmax) liegt meist unterhalb des Ranibizumabspiegels, der nötig ist um die biologische VEGF-Aktivität um die Hälfte zu hemmen. Die Eliminationshalbwertszeit aus dem Glaskörper beträgt etwa 2-4 Tage.

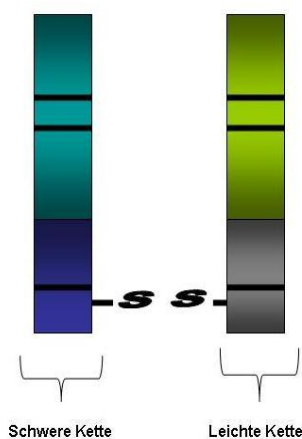


Abbildung 4: Der molekulare Aufbau des Fab-Fragments Ranibizumab mit schwerer und leichter Kette

In der 24 monatigen „MARINA“ –Studie bekamen insgesamt 478 Patienten über Monate intravitreale Lucentis®-Injektionen in den Dosierungen 0.3 mg, 0.5 mg und Scheininjektionen. Es stellte sich heraus, dass nicht nur der weitere Visusverlust verhindert werden konnte, bei 25% unter der 0,3 mg-Dosierung und 34% unter der 0,5 mg-Dosierung kam es zu einer Visusverbesserung (Rosenfeld et al. 2006).

In der zweiten Studie, „ANCHOR“, wurde Ranibizumab mit der Phototherapie unter Verwendung von Verteporfin verglichen. Durchschnittlich verbesserte sich der Visus entscheidender in der Gruppe mit 0,5 mg Ranibizumab- Injektion (Brown et al. 2006). Die Dosierung liegt nach EMEA- Angaben bei der feuchten AMD bei 0,5 mg, verabreicht monatlich als intravitreale Einzelinjektion. Lucentis® sollte in den ersten 3 Monaten alle 4 Wochen injiziert werden.

1.5.4 Aflibercept (Eylea®)

Aflibercept wird aus der zweiten Immunglobulin-Domäne des VEGFR-1 Rezeptors, und der dritten Immunglobulin-Domäne des VEGFR-2 Rezeptors, gebunden an die konstante Region (Fc) von humanem IgG1 hergestellt und hat eine Größe von etwa 110kDa (Holash et al. 2002).

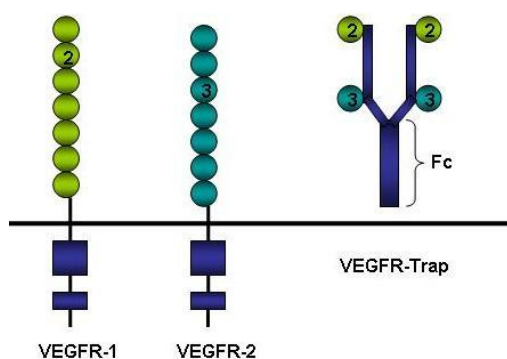


Abbildung 5: Der molekulare Aufbau von Aflibercept (mod. nach: a.Thomas: Targeting VEGF, 2007)

Es bindet im Gegensatz zu allen vorher vorhandenen Molekülen an alle VEGF-A Isoformen sowie PlGF. Die empfohlene Dosierung liegt bei 2mg intravitreal zunächst 3 Monate lang alle 4 Wochen, nachfolgend sollten 2mg noch alle 8 Wochen intravitreal injiziert werden. Mit Aflibercept gelang es bereits in mehreren Studien Tumoren fast vollständig zu avaskularisieren. Die Affinität zu VEGF ist größer als die von Ranibizumab, etwa 800x höher als von Bevacizumab. In der ersten Phase-III-Studie („COPERNICUS“) wurde bei 56,1 Prozent der mit 2 mg Aflibercept einmal monatlich behandelten Patienten mit Zentralvenen-Verschluss ein verbessertes Sehvermögen um mindestens 15 Buchstaben im Vergleich zu 12,3 der Kontrollgruppe erzielt. Zurzeit wird die Anwendung bei der feuchten AMD in der Studie „View-2“ erprobt.

1.5.5 Vergleich

| | Avastin® (Bevacizumab) | Macugen® (Pegaptanib) | Lucentis® (Ranibizumab) | Eylea® (Aflibercept) |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Molekulargewicht (kDa) | 149 | 49 | 48 | 96,90 |
| Halbwertszeit im Glaskörper | 5–6 d | 4 d | 2–4 d | 7,31 d |
| Halbwertszeit im Serum | 20(11–50) d | 10±4 d | 2–4 h | 25 d |

Tabelle 2: Vergleich der aktuell zugelassenen Medikamente (modifiziert nach C.H.Meyer
Intravitreale Injektion)

Untersuchungen zwischen Pegaptanib und Ranibizumab ergaben, dass Pegaptanib lediglich den Status erhält, also einen weiteren Verlust der Sehschärfe vorerst aufhalten, Ranibizumab jedoch zu einer Verbesserung der Sehschärfe führen kann (Colquitt et al. 2008; Gragoudas et al. 2004).

Betrachtet man die Wirkung von Bevacizumab und Ranibizumab so wurde in der aktuellen CATT-Studie nach 1 Jahr festgestellt, dass es keinen Unterschied in der Verbesserung der Sehkraft gibt, beide wirken gleich gut bei gleicher zeitlicher Gabe. (Martin et al. 2011). Ranibizumab neutralisiert VEGF besser wenn es in niedrigen Konzentrationen vorliegt und hat eine höhere retinale Penetrationskraft. Daher ist derzeit die Therapie erster Wahl bei AMD Ranibizumab (Lucentis ®). Für beide Moleküle wurden systemische Nebenwirkungen festgestellt (Meyer und Holz 2011).

In den parallel und identisch durchgeführten Phase 3 Studien View 1 und 2 wurde die Wirksamkeit von Aflibercept (Eylea®) mit der von Ranibizumab verglichen. Aflibercept Patienten benötigten eine weniger intensive Therapie als Ranibizumab Patienten. Die Injektion von 2mg Aflibercept alle 8 Wochen war klinisch äquivalent mit der Monatlichen Injektion von 0.5 mg Ranibizumab.

1.6 Physiologisches Anti-VEGF- Molekül sFlt-1

1.6.1 Physiologische Funktion

Schon seit längerem bekannt ist die natürlich vorkommende Form des VEGF-Rezeptors 1, das nicht membrangebundene sFLT-1.

sFlt-1 steht für soluble fms-like tyrosine kinase receptor, ein löslicher Faktor der durch seine Bindung an VEGF eine hemmende Wirkung auf die VEGF-Aktivität hat (Kendall und Thomas 1993). sFLT-1 bindet VEGF mit hoher Affinität und verhindert somit eine Interaktion mit dem membrangebundenen VEGFR -1 Rezeptor. Ein Auslösen der Signalkaskade zur Proliferation neuer Gefäße wird somit verhindert. Eine große Rolle spielt sFlt-1 zum Beispiel für die Erhaltung der Avaskularität der Cornea (Ambati et al. 2006). Es sind konstante Spiegel notwendig um die Cornea frei von Gefäßen zu halten umso die optimale Brechkraft zu erhalten.

1.6.2 Spliceformen

sFLT-1 mRNA entsteht durch alternatives Splicen der gleichen prä-mRNA, aus der der membranständige Rezeptor VEGFR -1 entsteht. Es ist eine 6 N-terminale extrazelluläre Ligandenbindungsstelle der eine Disulfidbrücke sowie die Transmembranomäne und die Kinasedomäne fehlt (Abb.6). Bis heute sind 4 Splicevarianten von sFlt-1 bekannt (Heydarian et al. 2009).

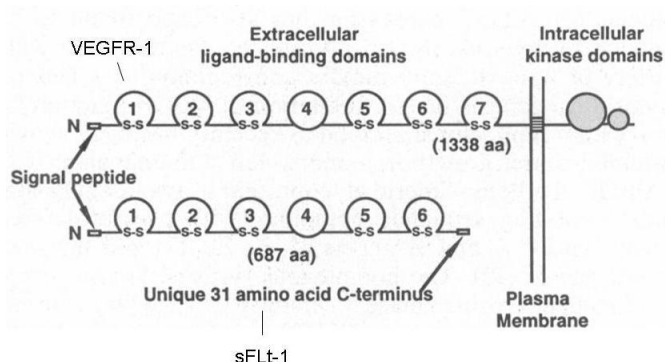


Abbildung 6: Schema der Struktur des VEGFR-1 und sFlt-1 (modifiziert nach Kendall, 1993)

| | Isoform 1 | Isoform 2 | Isoform 3 | Isoform 4 |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Aminosäure | 1...349 | 1...597 | 1...349 | 1...349 |
| Locus | NM_002019 | NM_00120712 | NM_001160030 | NM_001160031 |
| Länge (bp) | 7123 | 1848 | 2968 | 1911 |

Tabelle 3: Isoformen von sFlt-1 nach NCBI

1.6.3 Pathologische Auswirkung

Ein pathologisch erhöhter sFlt-1 Spiegel kann negative Folgen für den Organismus haben. Als Beispiel dafür dient die schwangerschaftsbedingte Erkrankung Präeklampsie, bei der man erhöhte sFlt-1 Spiegel (gegenüber normaler Schwangerschaft) festgestellt hat (Maynard et al. 2003). Ursächlich ist eine vermehrte sFlt-1 Produktion in der Plazenta. (Smith et al. 2007). Dieser Prozess führt durch das gesteigerte Abfangen von VEGF zu Veränderungen der Gefäße in der Plazenta. Dadurch kommt es zu Schwangerschaftshypertension sowie zu einer Proteinurie, die mit einer speziellen Variante der thrombotischen Microangiopathie assoziiert ist. Bei dieser Microangiopathie stellte man eine Schwellung der glomerulären Endothelzellen, den Verlust fenestrierter Kapillaren sowie den Verschluss kapillarer Lumen fest. Diese Pathomechanismen am Filtrationsapparat werden durch sFlt-1 verursacht, der den glomerulären Endothelzellen das benötigte VEGF entzieht indem es vorher abgefangen wird. Da im Glomerulum von den Podozyten normalerweise kontinuierlich VEGF produziert wird, kommt es durch VEGF-Mangel zur Proteinurie (Stillman und Karumanchi 2007). In einer Studie von Rolfo und Kollegen wurde klar, dass sich sFlt-1 zusammen mit PlGF eignet, um eine Differenzierung zwischen Präeklampsie und chronischer Nierenkrankheit zu ermöglichen. Dazu muss man ein Verhältnis aus den Konzentrationen beider Marker im maternalen Serum bilden. Bislang gab es keinen Marker der diese Differenzierung ermöglichte (Rolfo et al. 2013).

Eine neue Studie zur bronchopulmonalen Dysplasie konnte die Korrelation zwischen intrauterin erhöhtem sFlt-1 Spiegel und dem vermehrten Auftreten dieser Erkrankung aufzeigen (Tang et al. 2012). Die negativen Auswirkungen einer Überexpression von sFlt-1 wie vaskuläre Dysfunktion und intrauterine Wachstumsabnormalität konnten mit einer VEGF-121 Therapie abgeschwächt werden.

1.7 Transgene Expression von sFLt-1 als therapeutisches Agens

1.7.1 Kontinuierliche Expression von sFLt-1

Um transgene Proteine in der Netzhaut zu exprimieren nutzt man Adeno-assoziierte Virus Vektoren (AAV). Wichtige Vorteile dieser Systeme sind die mangelnde Humanpathogenität und die Möglichkeit der dauerhaften Expression (Le Bec und Douar 2006). Unterschiedliche Serotypen haben definierte Zelltropismen in der Netzhaut und werden mit entsprechenden Zahlen versehen (AAV1-12).

sFLt-1 wurde bereits in einigen Experimenten mithilfe von AAV kontinuierlich in der Retina exprimiert (Honda et al. 2000; Lai et al. 2005; Gehlbach et al. 2003; Rota et al. 2004) und konnte in laserinduzierten Mausmodellen und im ROP Modell eine Reduktion der Neovaskularisation bewirken (Bainbridge et al. 2002; Lai et al. 2002). Basierend auf diesen Studien hat eine australische Forschergruppe einen AAV-2 Vektor entwickelt, der sFLt-1 kontinuierlich exprimiert, und diesen am Primatenmodell getestet. Bis heute wurde in Studien die Behandlung vor allem mit AAV-2 Vektoren vorgenommen, es ist aber möglich, dass die Transduktionseffizienz, vor allem für Photorezeptoren, in AAV-5 Vektoren größer ist (Yang et al. 2002). Zusätzlich zeigten Lebherz und Kollegen, dass AAV- 7 und 8 Vektoren eine bessere Langzeittransduktion in den retinalen Strukturen im Tiermodell ermöglichen (Lebherz et al. 2008). Diese Ergebnisse veranlassten Igarashi und Kollegen zum Vergleich der Wirksamkeit von AAV-5 und AAV-8 Vektoren in ihrem murinen CNV-Modell. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant höhere Transduktionseffizienz für AAV-8 Vektoren. Demnach sind sie am besten geeignet um Gene in retinales und choroidales Gewebe zu transferieren und die benötigte AAV-Dosis zu reduzieren um somit sichere Studien durchzuführen (Igarashi et al. 2010).

sFLt-1 diffundiert frei im gesamten retinalen Gewebe und muss nur in einem kleinen Teil der retinalen Peripherie exprimiert werden, um therapeutische Konzentrationen zu erhalten. Ergebnisse aus aktuellen klinischen Studien (Tab.4) zeigen ermutigende Ergebnisse für die Zukunftstherapie mit AAV-Vektoren. Lai und Kollegen zeigten in ihrer Langzeit-Sicherheitsstudie an nicht-humanen Primaten, dass die subretinal applizierten AAV2 Vektoren im Auge verblieben. Es besteht also kaum Gefahr eine systemische Wirkung hervorzurufen. Es wurden nur sehr geringe Mengen im Sehnerv oder Chiasma gefunden, diese riefen jedoch keine Einschränkungen des Verhaltens

oder Sehens der Tiere hervor. Weiterhin konnten sie mit immunologischen Tests beweisen, dass keine Immunreaktionen ausgelöst wurden (Lai et al. 2012). In einer aktuellen Phase 2 Studie wird in Australien, die Wirkung von ein oder zwei Dosen von intraokular injiziertem rAAV.sFlt-1 bei Patienten mit feuchter AMD überprüft. Aktuell werden Patienten ab 55 Jahren für diese Studie rekrutiert (Tabelle 4).

Pechan und seine Mitarbeiter veröffentlichten 2009 einen Artikel, in dem sie zwei sFlt-1- Chimäre erzeugten, sFlt-01 und sFlt-02 . Diese bestehen aus der zweiten IgG-like Domäne und einer humanen IgG1Fc oder CH3 Domäne des IgG1 Fc, verbunden über ein Polyglycin. In ihren in vitro Analysen zeigte sich, dass vor allem das neue Molekül sFlt-01 eine sehr hohe Affinität zu VEGF hat und damit einen potenten Inhibitor darstellt. Sie fanden heraus, dass vor allem die zweite Domäne für die Bindungskraft an VEGF verantwortlich ist. Es wurden nach 12 monatiger AAV2 vermittelter Expression von sFlt01 in der Netzhaut in vivo im Mausmodell keine histologischen Veränderungen beobachtet die auf eine Toxizität hinweisen (Pechan et al. 2009).

Lukason et al. konnten durch das Applizieren von AAV2-sFLT01 im Primatenmodell eine dosis-abhängige und über 5 Monate persistierende Expression von sFLT01 messen. Durch In Situ Hybridisation konnten die transitionalen Epithelzellen der Pars Plana sowie retinale Ganglienzellen als Ort der Transduktion ausgemacht werden. AAV2-sFLT01 war in der Lage laserinduzierte Choroidale Neovaskularisationen effektiv zu hemmen (Lukason 2011).

In einer 12-monatigen Sicherheitsstudie überprüften MacLachlan et al. nach intravitrealer Injektion von AAV2-sFLT01 Vektoren an Cynomolgus Makaken (in den Dosierungen 2.4×10^9 und 2.4×10^{10} vector genom=vg) die Expressionsrate des sFLT01-Proteins sowie lokale Reaktionen des Gewebes. Nach einem Monat zeigte sich der Gipfel der sFLT01- Proteinmenge, die für den Rest des Untersuchungszeitraumes relativ konstant blieben. Mithilfe monatlicher indirekter Ophthalmoskopie und Spaltlampenuntersuchungen konnte bei der Gruppe mit der hochdosierten Injektion eine moderate Inflammation festgestellt werden, die sich ohne weitere Behandlung selbst limitierte. In einer Follow-Up Studie wurde der gleiche Grad an Inflammation bei Injektion des reinen AAV2-Kapsids gefunden, was für eine Immunreaktion gegen das Kapsid, nicht aber gegen das sFLT01 Protein spricht. Im nicht-injizierten Auge fanden sich Spuren des Vektors unterhalb der Bestimmungsgrenze (MacLachlan et al. 2011).

SFlt-1 zeigt in vivo in verschiedenen Mausmodellen eine hohe Antitumor-Aktivität. In präklinischen Tumormodellen wie H460 des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, HT29 Kolonkarzinom, Karpas 299 Lymphom oder auch MOLM-13 AML wurden unter sFlt-1 Behandlung weniger Endothelzellen und Perizyten im untersuchten Tumor nachgewiesen. Im A673 Ewing-Sarkom Modell zeigte sich eine deutlich stärkere Inhibition des Tumorwachstums unter Kombination von sFLT01 und Cyclophosphamid als unter Einsatz der jeweils einzelnen Substanzen (Bagley et al. 2011). Aufgrund dieser Ergebnisse kann sFLT01 als ein potentes Fusionsprotein der nächsten Generation antiangiogener Therapeutika in der Onkologie gesehen werden.

| Durchgeführt von: | Thema | Status |
|--|--|--|
| Rakoczy, Constable Australien, 2013 | Safety and Efficacy Study of rAAV.sFlt-1 in Patients With Exudative Age-Related Macular Degeneration (AMD) | Phase 2 Rekrutieren der Patienten ClinicalTrials: NCT01494805 |
| Genzyme USA, 2014 | Safety & Tolerability Study of AAV2-sFLT01 in Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration (AMD) | Phase 1 Beginn aber noch kein Rekrutieren der Patienten ClinicalTrials: NCT01024998 |

Tabelle 4: Aktuelle Studien zur kontinuierlichen sFlt-1 Expression

1.7.2 Regulierbare Expression von sFlt-1

Die kontinuierliche Expression antiangiogener Faktoren in der Netzhaut als Therapiekonzept ist bisher umstritten, da eine völlige und langanhaltende Hemmung der VEGF-Aktivität unerwünschte Nebenwirkungen verursachen kann. Dies liegt hauptsächlich daran, dass VEGF neben seinen schädlichen Folgen auch ein wichtiger protektiver Faktor für Endothelzellen ist und an der Vaskularisation der Retina sowie der Nährstoffversorgung von Nerven Teil hat (Campochiaro 2007). Über längere Zeit zirkulierende anti-VEGF Moleküle können eine Schädigung an fenestrierten Kapillaren in endokrinen Organen hervorrufen (Baffert et al. 2006; Kamba et al. 2006). Saint-Geniez und Kollegen haben mithilfe adenoviraler Expression von sFLT-1 systemisch VEGF neutralisiert. In der Mausretina kam es nach vier Wochen zu einem enormen Anstieg der Apoptose Rate in den Nervenzellen sowie zu einer Abnahme der retinalen Funktion. Gleichzeitig demonstrierte die Zugabe von VEGF zu frisch isolierten Photorezeptorzellen seine neuroprotektive Wirkung (Saint-Geniez et al. 2008). Um solche Nebenwirkungen zu verhindern sollte die Expression des transferierten Gens in der Retina regulierbar sein. Mithilfe von Regulationssystemen könnte man die Expression von anti-VEGF Molekülen nur kurzzeitig anschalten um somit ähnliche Konzentrationskurven zu erzeugen wie sie bei den synthetisch hergestellten Molekülen nach der intraokularen Injektion auftreten. Zurzeit ist das Tetracyclin-abhängige System am besten studiert (Gossen und Bujard 1992; Gossen et al. 1995). Die Expression des kontrollierten Gens ist von der Anwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin abhängig. Dies bedeutet, dass nur bei Anwesenheit eines der beiden Antibiotika der Aktivator seine Konformation ändert und den 2.Promotor aktiviert um das therapeutische Protein herzustellen (TetOn) (Abb. 7). Sollte das Gen mit seiner Wirkung nicht mehr benötigt werden oder wider Erwarten Nebenwirkungen hervorrufen, kann die Expression durch Fortlassen des Induktionsmoleküls (Doxycyclin) gestoppt werden (Goverdhan et al. 2005).

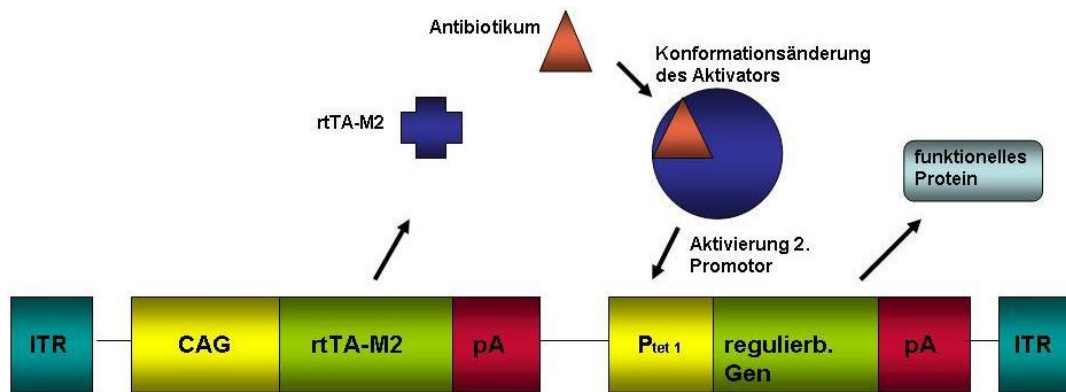


Abbildung 7: Design des Regulationssystems Tet-On (Quelle: Stieger, Augenklinik Gießen)

Stieger et al. nutzte dieses System bereits um in der Primatenretina nach subretinaler Injektion von rAAV Vektoren die Produktion des Reporterproteins EPO zu steuern (Stieger et al. 2006; Stieger et al. 2007). Mit dieser Studie sollte die Sensitivität des TetOn Systems für verschiedene Doxycyclin-Dosen untersucht werden, ebenso die Wirksamkeit einer oralen Doxycyclin-Gabe an Makaken. Alle in Abbildung 8 aufgeführten Makaken erhielten AAV einseitig in die rechte Retina appliziert. Um eine vereinfachte Anwendung für klinische Studien zu testen wurde anstelle intravenöser Applikation Doxycyclin in Trockenfrüchten in einer Dosis von 5 und 10mg kg⁻¹ verabreicht. Die erreichten Epo Level waren annähernd ähnlich denen mittels i.v. Injektion, es zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Epo-Konzentration nach Doxycyclin-Gabe.

Mit dieser Studie konnte deutlich gezeigt werden, dass eine transgene Expression stabiler Proteinlevel in der Retina möglich ist, da das Doxycyclin-regulierbare System nicht durch das Immunsystem ausgeschaltet wird. Die Expression von Epo in der Retina zeigte sich abhängig von der verabreichten Doxycyclin-Dosis und in Langzeitbeobachtungen konnte eine konstante Regulierbarkeit bis 4 Jahre post injectionem nachgewiesen werden (Stieger et al. 2007).

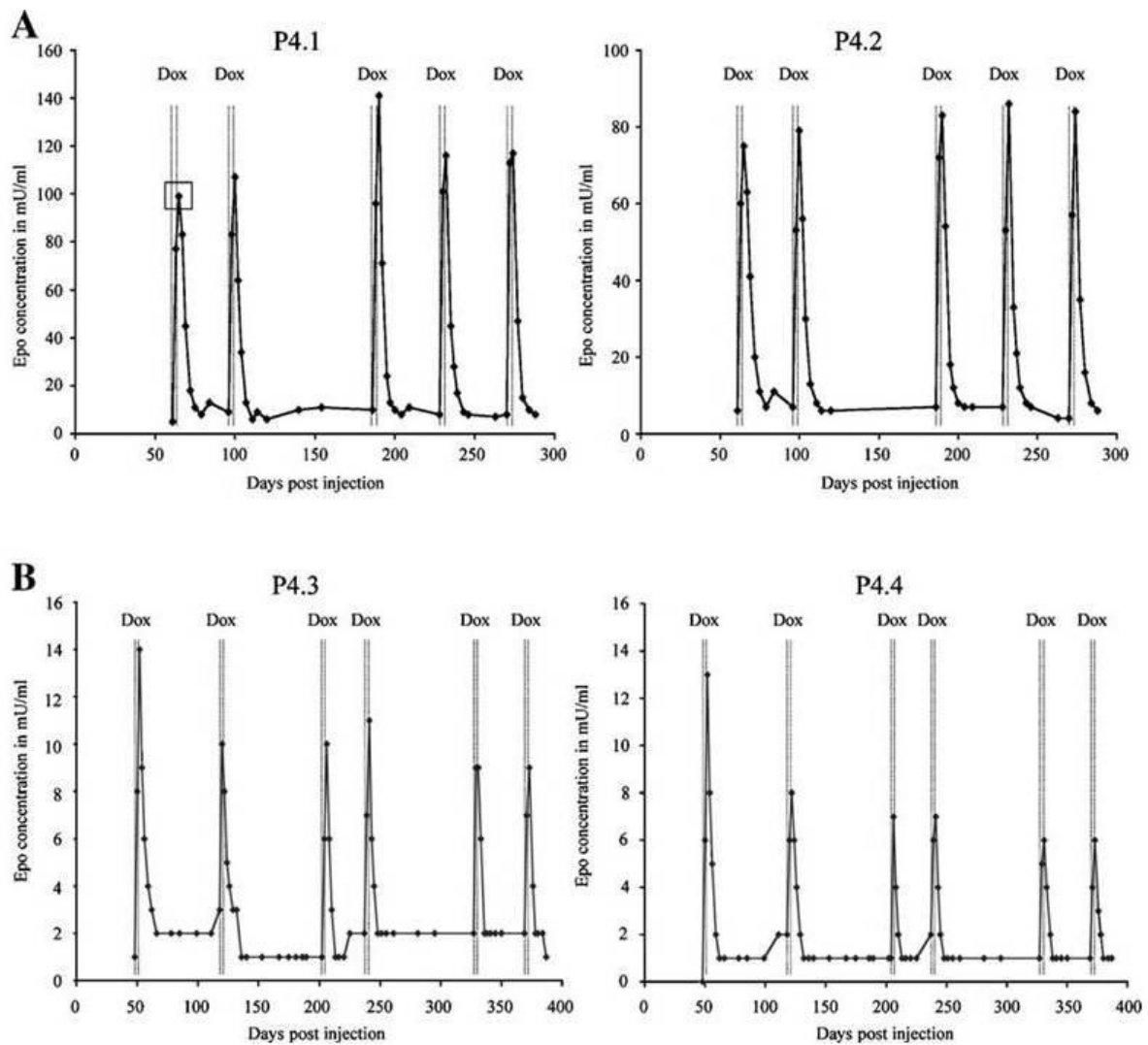


Abbildung 8: Zeitlicher Zusammenhang der Epo-Konzentration nach subretinaler Injektion von AAV2/TetOn-Epo (Stieger 2007)

Indem verschiedene AAV- Serotypen genutzt werden, können unterschiedliche Zellen der Retina transduziert werden und somit die Konzentration des herzustellenden Transgenes der entsprechenden therapeutischen Konzentration angeglichen werden. (Stieger et al. 2009). Da die Pharmakokinetik von Doxycyclin beim Menschen und nichthumanen Primaten gleich sind, kann man davon ausgehen, dass die Regulation der transgenen Expression unter Nutzung des TetOn-Systems gleich effizient funktionieren wird (Kelly et al. 1992).

1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines Expressionssystems, mit dem in eukaryotischen Zellen in vitro die regulierbare Expression des anti-VEGF Moleküls sFlt-1 möglich ist. Dazu wurde corneale RNA mithilfe von spezifischen sFlt-1 Primern per reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und die sFlt-1 cDNA in ein regulierbares Expressionsplasmid kloniert, welches sich auch zur Produktion von AAV Vektoren eignet. Die regulierbare Expressionskassette wurde in vitro auf ihre Funktionalität geprüft, das hergestellte sFlt-1 im Western-Blot nachgewiesen und mittels Aktivitätsassay überprüft. Diese Experimente dienen als Vorarbeit für eine spätere Anwendung des Systems in vivo, zunächst im Mausmodell und später bei Patienten mit AMD, DR und ROP.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.2 Puffer

| | |
|---|----------------------------------|
| Antarktische Phosphatase Puffer | New England BioLabs (Schwalbach) |
| EcoRI-Puffer | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| PstI-Puffer | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| SmaI-Puffer | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Ladepuffer 6x Loading Dye | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| NEB 3+ Puffer | New England BioLabs (Schwalbach) |
| NE-Puffer | Macherey-Nagel (Düren) |
| Orange-Puffer | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| S1 (Resuspensions)-Puffer | Macherey-Nagel (Düren) |
| S2 (Lyse)-Puffer | Macherey-Nagel (Düren) |
| S3 (Neutralisations)-Puffer | Macherey-Nagel (Düren) |
| SDS Probenpuffer Roti Load 1 (reduziert) | Carl Roth (Karlsruhe) |
| SDS Probenpuffer Roti Load 2 (nicht reduziert) | Carl Roth (Karlsruhe) |
| T4-DNA-Ligase 5x Puffer | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Tango-Puffer | Fermentas (St. Leon-Rot) |

Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen

DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium): PAA Cölbe

DMEM wurde zur Kultivierung von humanen Pigmentepithelzelllinien der Retina (arpe19), humanen Zervixadenokarzinom-Zellen (HeLa) sowie humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) genutzt. DMEM wurde mit 1% Pen/Strep (v/v), 10% FKS (v/v), 200 mg/l Calciumchlorid und mit L-Glutamin-4 mM angesetzt. Es wurde bei 4°C gelagert.

PBS (phosphate buffered saline):

8,0 g/l Natriumchlorid
0,2 g/l Kaliumchlorid
1,44 g/l Dinatriumhydrogenphosphat
0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
(pH-Wert 7,4; autoklaviert; bei RT gelagert)

Einfrierlösung:

(steril gefiltert, bei -20°C gelagert)
10% DMSO
90% FKS

LB-Medium:

10,0 g/l Trypton
5,0 g/l NaCl
5,0 g/l Hefeextrakt
pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren

TE-Puffer:

1,21 g/l Tris
1,86 g/l EDTA
pH 8,0

Ethidiumbromidlösung:

0,1 g/ml Ethidiumbromid

Ampicilin-Stammlösung:

34,5 µg/ml Ampicilin

HEPES-Lösung:

1 mM HEPES

LB-Agar:

LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar

(autoklavieren, bei Temperatur unter 50°C Selektionsmedium zugeben, Gießen der Platten mit jeweils ca. 15 ml LB-Agar, Aufbewahrung bei 4°C, Platten ca. 6 Monate verwendbar)

10x SDS-Laufpuffer:

30 g/L Tris

144 g/L Glycin

100 ml SDS (10%)

pH 8,3

Blocking-Puffer:

5% (w/v) Milchpulver in 1 x TBS

10 x TBS:

12,11 g/L Tris

87,75 g/L NaCl

pH 7,5 mit HCl

TBS-Tween-Puffer:

1 x TBS

0,05% Tween 20

TBS-TT-Puffer:

0,05% Tween 20

0,2% Triton X100

Coomassie-Entfärbelösung:

120 ml Methanol

100 ml Essigsäure

qsq 1 Liter H₂O

Western-Blot Transferpuffer :

11,6 g Tris
 5,8 g Glycin
 400 ml Methanol
 qsq 2 Liter H₂O
 pH 8,2–8,4 (wird nicht eingestellt)

2.3 PCR-Primer

Einzelsträngige, synthetische Desoxyribooligonukleotide, die als Startermoleküle (Primer) für die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) dienen, wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) bezogen. (siehe Tab.3, P entspricht 5'Phosphatgruppe)

| Primername: | Sequenz: | Fragment: |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------|
| SSV9-EpoF2 | ccaccacgcctcatctgtga | SSV9-Epo-TetOn |
| SSV9-EpoR1 | acaaaggcattaaagcagcg | SSV9-Epo-TetOn |
| SSV9-F4 | ccatcactcttaatcttacc | SSV9 TetOn sFlt1 |
| SSV9-R3 | agtcagtgcgaggaagcgga | SSV9 TetOn sFlt1 |
| SSV9-F3 | gtgggccactttacactggg | SSV9 TetOn sFlt1 |
| SSV9-F2 | ccccgctccgcgccgcctcg | SSV9 TetOn sFlt1 |
| SSV9-R2 | tgagctgtgtcaaggtaa | SSV9 TetOn sFlt1 |
| SSV9-F1 | tataatcagtgaggccaccg | SSV9 TetOn sFlt1 |
| SSV9-R1 | atgatacactgatgtactgcc | SSV9 TetOn sFlt1 |
| sFlt1 mut r | ccctgcagaattcggttagcgctca | sFlt1 Mutagenese PCR |
| sFlt-1 2g | ttagcaacagtgcacaataaatcaagatg | sFlt-1 RT-PCR |
| sFlt-1 2f | actgggcagcagacaaatcctgac | sFlt-1 RT-PCR |
| sFlt-1 2e | tcctccgctcggcatttt | RT PCR Fragment von sFlt-1 |
| sFlt-1 2d | gcgctcaccatgggtcagcta | RT PCR Fragment von sFlt-1 |
| sFlt-1 2c | cccacagtcccaactttattg | RT PCR Fragment von sFlt-1 |
| sFlt-1 2b | accaagtgcgccccccggag | RT PCR Fragment von sFlt-1 |

| | | |
|---------------|---|----------------------------|
| sFlt-1 2a | Cactcctctcggctcctccccg | RT PCR Fragment von sFlt-1 |
| sFlt-1-HISSr1 | P-5'catcatcattaaaggactcattaaaaagta-3' | pcDNA3.1 (+) sFlt-1 Mutag. |
| sFlt1-HISr1 | P-5'-atg atg atg ttt tac ctt act ttg tgt-3' | pcDNA3.1 (+) sFlt-1 Mutag. |

2.4 Reagenzien und Kits

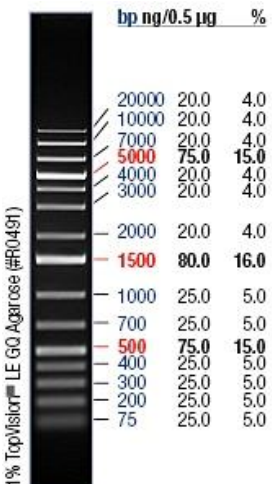
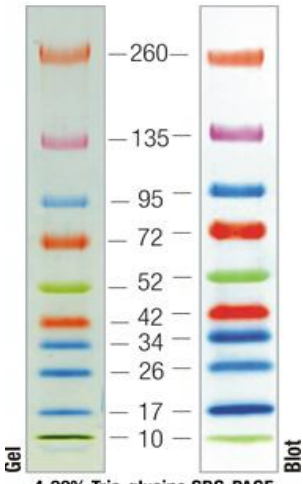
| | |
|---|--|
| Coomassie Plus-The Better Bradford™ Assay Kit | Pierce (Rockford, USA) |
| cDNA Synthese Kit RevertAid™ | Fermentas (St.Leon-Rot) |
| DMEM | PAA (Cölbe) |
| ECL Westernblotting Detection Reagent | GE Healthcare (München) |
| FCS (fötales Kälberserum) | PAA (Cölbe) |
| M-Per® Mammalian Protein Extraction Reagent | Thermo Fisher Scientific (Schwerte) |
| Nucleo Spin® Plasmid Mini Kit | Macherey Nagel (Düren) |
| Penicillin/Streptomycin | PAA (Cölbe) |
| Qiagen® Hot-Star PCR-Kit | Qiagen (Hilden) |
| Qiagen Plasmid Plus Midi Kit | Qiagen (Hilden) |
| Qiagen Plasmid Plus Maxi Kit | Qiagen (Hilden) |
| Quantikine Human VEGFR 1/Flt-1 Kit | R&D systems (Abingdon,UK) |
| Takara High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit | Takara Bio Inc. (St Germain en Laye, France) |

2.5 Enzyme

| | |
|--------------------------|----------------------------------|
| Antarktische Phosphatase | New England BioLabs (Schwalbach) |
| BamHI | New England BioLabs (Schwalbach) |
| EcoRI | Fermentas (St.Leon-Rot) |
| EcoRV | New England BioLabs (Schwalbach) |

| | |
|---------|----------------------------------|
| HindIII | New England BioLabs (Schwalbach) |
| NdeI | New England BioLabs (Schwalbach) |
| NheI | New England BioLabs (Schwalbach) |
| NotI | New England BioLabs (Schwalbach) |
| PstI | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| SmaI | Fermentas (St. Leon-Rot) |

2.6 DNA-und Protein-Größenstandards

| DNA-Größenstandard: | Protein-Größenstandard für SDS-Page : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----------|---|-------|------|-----|-------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|------|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|-----|------|------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|----|------|-----|--|
| <div><div><div>1% TopVision™ LE GG Agarose (#R0491)</div></div><table><thead><tr><th>bp</th><th>ng/0.5 µg</th><th>%</th></tr></thead><tbody><tr><td>20000</td><td>20.0</td><td>4.0</td></tr><tr><td>10000</td><td>20.0</td><td>4.0</td></tr><tr><td>7000</td><td>20.0</td><td>4.0</td></tr><tr><td>5000</td><td>75.0</td><td>15.0</td></tr><tr><td>4000</td><td>20.0</td><td>4.0</td></tr><tr><td>3000</td><td>20.0</td><td>4.0</td></tr><tr><td>2000</td><td>20.0</td><td>4.0</td></tr><tr><td>1500</td><td>80.0</td><td>16.0</td></tr><tr><td>1000</td><td>25.0</td><td>5.0</td></tr><tr><td>700</td><td>25.0</td><td>5.0</td></tr><tr><td>500</td><td>75.0</td><td>15.0</td></tr><tr><td>400</td><td>25.0</td><td>5.0</td></tr><tr><td>300</td><td>25.0</td><td>5.0</td></tr><tr><td>200</td><td>25.0</td><td>5.0</td></tr><tr><td>75</td><td>25.0</td><td>5.0</td></tr></tbody></table></div> | bp | ng/0.5 µg | % | 20000 | 20.0 | 4.0 | 10000 | 20.0 | 4.0 | 7000 | 20.0 | 4.0 | 5000 | 75.0 | 15.0 | 4000 | 20.0 | 4.0 | 3000 | 20.0 | 4.0 | 2000 | 20.0 | 4.0 | 1500 | 80.0 | 16.0 | 1000 | 25.0 | 5.0 | 700 | 25.0 | 5.0 | 500 | 75.0 | 15.0 | 400 | 25.0 | 5.0 | 300 | 25.0 | 5.0 | 200 | 25.0 | 5.0 | 75 | 25.0 | 5.0 | <div><div><div>Gel</div><div>Blot</div></div><p>4-20% Tris-glycine SDS-PAGE</p></div> |
| bp | ng/0.5 µg | % | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20000 | 20.0 | 4.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10000 | 20.0 | 4.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7000 | 20.0 | 4.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5000 | 75.0 | 15.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4000 | 20.0 | 4.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3000 | 20.0 | 4.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2000 | 20.0 | 4.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1500 | 80.0 | 16.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1000 | 25.0 | 5.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 700 | 25.0 | 5.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 500 | 75.0 | 15.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 400 | 25.0 | 5.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 300 | 25.0 | 5.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 200 | 25.0 | 5.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 75 | 25.0 | 5.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DNA Größenstandard GeneRuler 1 kb DNA-Ladder (Fermentas,St.Leon-Rot) | Spectra™Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, St.Leon-Rot) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2.7 Antikörper

Für die Detektion der Proteine auf der Nitrozellulose-Membran wurden folgende Antikörper verwendet:

| Primärantikörper | Sekundärantikörper |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| anti Flt-1 (Fitzgerald) | Rabbit anti-mouse IgA (Sigma) |
| Anti-VEGF Receptor 1 antibody [Y103] | Anti-rabbit IgG-HRP (Sigma) |

2.8 Rekombinantes sFlt-1

Als Positivkontrolle für den Western-Blot wurde rekombinantes, humanes sVEGFR-1 (native) von RELIA Tech (Wolfenbüttel) mit der Größe 96kDa verwendet.

2.9 Röntgenfilme und Membranen

Für die Western-Blots wurden Whatman Protran Nitrocellulose Membranen und Filterpapier von Biometra (Göttingen) benutzt. Es fanden Röntgenfilme von GE Healthcare (München) Verwendung.

2.10 Immunoassay

Für die quantitative Ermittlung der Konzentration von sVEGF R1 in Zellkulturüberständen und –Lysate wurde der Quantikine Human VEGFR 1/Flt-1 Kit von R&D systems (Wiesbaden) benutzt.

2.11 Vektoren und Plasmide

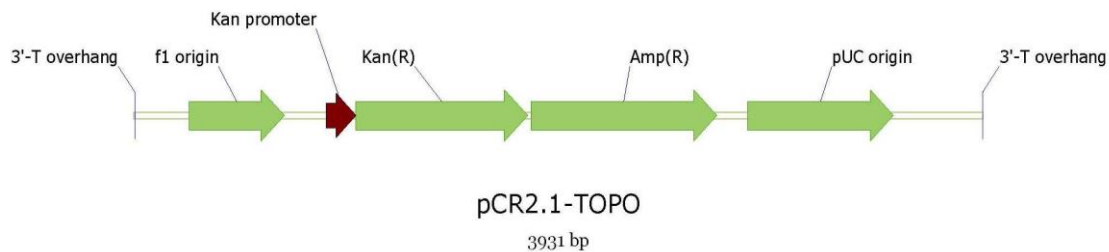


Abbildung 9: pCR2.1-Topo 3931bp (modifiziert nach Invitrogen, Karlsruhe)

| Abkürzung | Name | Nukleotid Position |
|------------|---------------------------------|--------------------|
| mcs | Multiple cloning site | 234-357 |
| f 1 ori | f1 origin of ss-DNA replication | 548-985 |
| Kan (R) | Kanamycin resistance | 1319-2113 |
| Amp (R) | ampicillin resistance | 2131-2991 |
| pUC origin | pUC origin of replication | 3136-3809 |

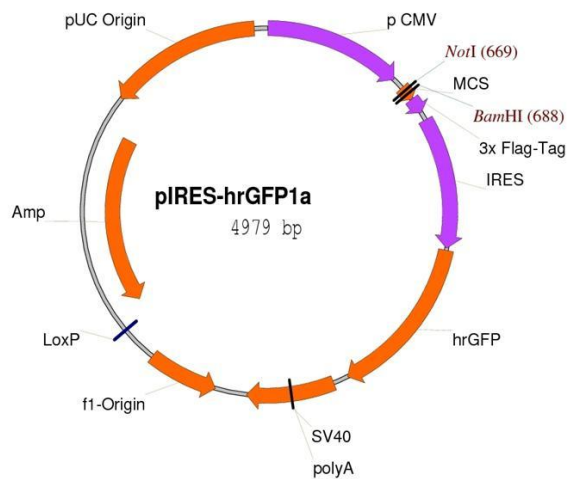


Abbildung 10: pIRES-hr-GFP1a (4979 bp) von Stratagene

| Abkürzung | Name | Nukleotid Position |
|------------|--|--------------------|
| CMV | CMV Promoter | 1-602 |
| MCS | Multiple cloning site | 651-715 |
| 3x FLAG | stop codon (in frame with 3x FLAG tag) | 677-679 |
| IRES | internal ribosome entry site (IRES) | 823–1397 |
| hr GFP | hrGFP ORF | 1407–2123 |
| SV40 pA | SV40 polyA signal | 2188–2571 |
| f1 ori | f1 origin of ss-DNA replication | 2709–3015 |
| LoxP | LoxP sequence | 3178–3211 |
| ampicillin | ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF | 3256–4113 |
| pUC ori | pUC origin of replication | 4260–4927 |

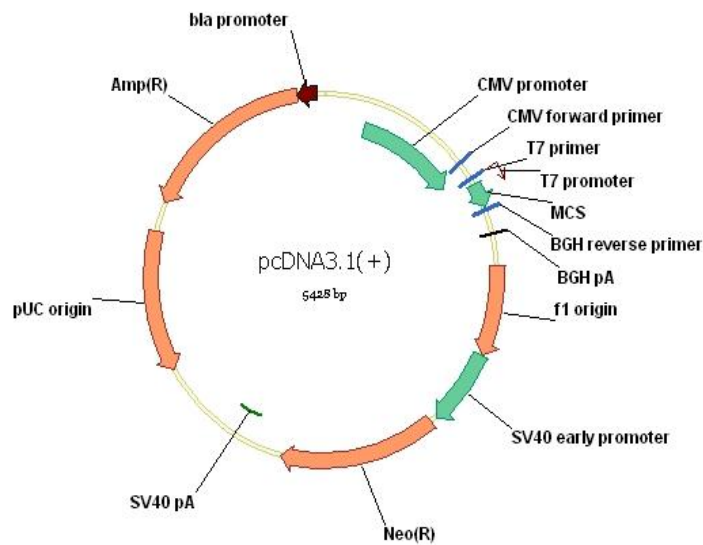


Abbildung 11: pcDNA3.1(+) (5428 bp)

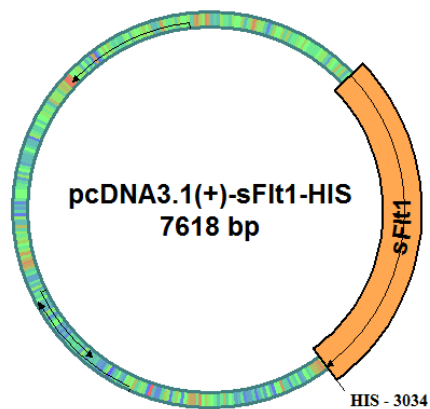


Abbildung 12: pcDNA3.1(+)-sFlt1-HIS (7618bp)

| Abkürzung | Name | Nukleotid-Position |
|-----------|---------------------------|--------------------|
| CMV | CMV Promoter | 232-819 |
| MCS | Multiple cloning site | 895-1011 |
| SV40 eA | SV40 early promotor | 1731-2101 |
| SV40 pA | SV40 poly A signal | 3104-3234 |
| pUC ori | pUC origin of replication | 3617-4287 |
| Amp (R) | Ampicillin resistance | 4432-5292 |
| bla | betalactamase-promoter | 5293-5391 |

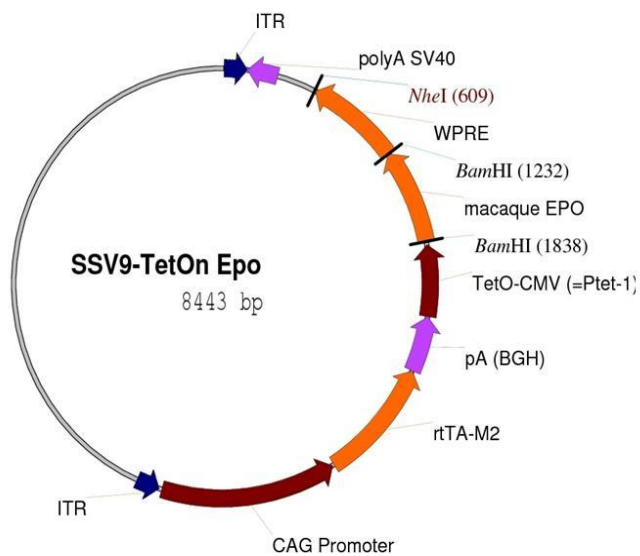


Abbildung 13: SSV9-TetOn-Epo (von Inserm n649 Universität Nantes, Frankreich)

| Abkürzung | Name | Nukleotid Position |
|-------------|--|--------------------|
| WPRE | Posttranscriptional Regulatory Element | 614-1230 |
| Macaque Epo | Erythropoetin signal (for Macaque) | 1231-1837 |
| TetOn-CMV | TetOn-CMV Promoter | 1858-2310 |
| pA (BGH) | polyA-Signal BovineGrowth Hormone-Gene | 2311-2664 |
| rtTA-M2 | Reverse tetracycline-controlled transactivator | 2665-3451 |
| CAG | CAG promoter | 3461-4610 |
| ITR | Internal ribosomal entry site | 4630-4780 |
| pA SV40 | Poly A signal SV40 | 151-350 |

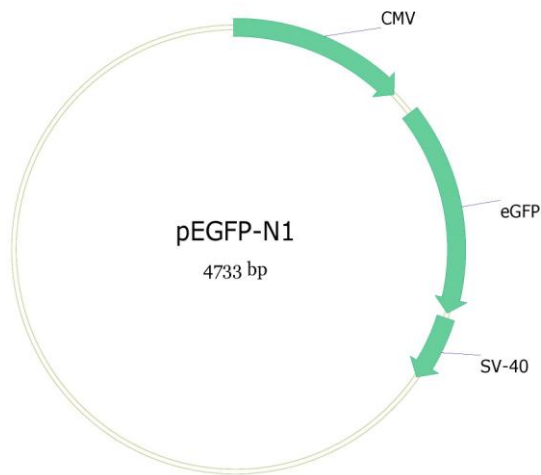


Abbildung 14: pEGFP-N1

| Abkürzung | Name | Nukleotid Position |
|-----------|---------------------------------|--------------------|
| eGFP | Grünes fluoreszierendes Protein | 679-1397 |
| CMV | Cytomegalie-Virus Promoter | 4728-596 |
| SV40 | signal SV40 | 1415-1639 |

2.12 Zelllinien

HEK 293 – Zelllinie (CLS: ATCC CRL-1573)

Die Abkürzung HEK 293 steht für **H**uman **E**mbryonic **K**idney cells (humane embryonale Nierenzelllinie), eine Zelllinie deren Wildtyp durch die Transfektion mit dem Adenovirus 5 zu einer dauerhaft kultivierbaren Form (293) umgewandelt wurde. Für dieses Projekt wurden die Zellen von Cell Lines Service (CLS, Eppelheim, Deutschland) bezogen und in DMEM mit Zusatz von 1% Pen/Strep, 4 mM L-Glutamin, 200 mg/l Calciumchlorid und mit 10% FKS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum) kultiviert.

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

HUVEC-Zellen stammen aus dem Endothel der Nabelschnurvenen von Neugeborenen. Sie wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und in Medium 200 (Invitrogen) mit LSGS Kit (Invitrogen) kultiviert.

2.13 E.coli-Stämme

Der *E.coli* XL-1 Blue Stamm kommt von dem *E. coli*-K12-Sicherheitsstamm. Angezüchtet wurden sie bei 37°C als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) in LB-Medium (Luria-Bertani) [Sambrook 1989]. Um nur resistenzvermittelnde Plasmide zu erhalten, wurde das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) zugegeben.

| Stamm | Phenotyp |
|---|---|
| <i>E. coli</i> XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla CA) | Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F-RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ |

2.14 Geräte

| | |
|-------------------------------------|---|
| 6-, 24- Well-Platten | Greiner (Frickenhausen) |
| Autoklav DX-65 | Systec (Wettenberg) |
| BioPhotometer | Eppendorf (Köln) |
| Cryo-Röhrchen (16 ml) | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Drucker für Photometer | Seiko Instruments GmbH (Neu-Isenburg) |
| Einweg-Pipettenspitzen | Corning (Wiesbaden), BioZym (Oldendorf) |
| Eismaschine | Scotsman (Herborn) |
| Elektrophorese - Kammer (DNA) | Biometra (Göttingen) |
| Elektroporationsküvette | Eppendorf (Köln), Bio Rad (München) |
| Entwicklungsgerät Curix 60 | Agfa (Düsseldorf) |
| Falcons (15ml) | Greiner (Frickenhausen) |
| Fastblot Whatman | Biometra (Göttingen) |
| Filter (Bottle Top, steril, 150 ml) | Corning (Wiesbaden) |
| Fluoreszenzmikroskop | Keyence (Neu-Isenburg) |
| Gefrierschränke | Liebherr (Ochsenhausen) |
| Gefrierschränke | VWR International (Darmstadt) |
| Gefrierschränke | Thermo Electron (Oberhausen) |
| Geldokumentation BioDocAnalyze | Biometra (Göttingen) |
| Gelkamm | Biometra (Göttingen) |
| Geltrockner Whatman Miditry | Biometra (Göttingen) |
| Glaspipetten (5 ml/10ml/20ml) | VWR (Darmstadt)/ Hirschmann (Eberstadt) |

| | |
|---|---|
| Handschuhe | NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. CoKG (Wetter) |
| Inkubationshaube | Sartorius AG (Göttingen) |
| Inkubator | Binder (Tuttlingen) |
| Laminar Flow | Fisher Scientific (Schwerte) |
| Lichtmikroskop | VWR International (Darmstadt) |
| Membranpumpen System I Whatmann | Biometra (Göttingen) |
| Mikrokühlzentrifuge 1-15PK | SIGMA (Osterode am Harz) |
| Mikrowelle | Siemens (Deutschland, gibt's überall) |
| Minizentrifuge | LMS (Ilemedenau) |
| Multiporator® | Eppendorf (Köln) |
| Netzgerät (Elektrophorese) Power Pack P25T | Biometra (Göttingen) |
| Neubauer Zählkammer improved | LO Laboroptik (Friedrichsdorf) |
| pH-Elektrode | Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz) |
| Pipetten | Eppendorf (Köln) |
| Pipetten | Brand (Wertheim) |
| Quarz-Küvette (10mm Dicke) | Hellma (Essen) |
| Thermoblock TB2 | Biometra (Göttingen) |
| Thermocycler TPersonal | Biometra (Göttingen) |
| Thermocycler TProfessional Basic Gradient | Biometra (Göttingen) |
| Tisch-Schüttler | Sartorius AG (Göttingen) |
| UV-Transilluminator | Allied Vision Technologies GmbH (Ahrensburg) |
| Vortexer | VWR International (Darmstadt) |
| Waage | Sartorius AG (Göttingen) |
| Wasserbad | Julabo (Seelbach) |
| Zellkultur Schalen (58 cm²) | Greiner (Frickenhäusen) |
| Zellkulturflaschen (25 cm²) | TPP (Trasadingen, Schweiz) |
| Zentrifuge 4K15 | SIGMA (Osterode am Harz) |
| Zentrifugenröhrchen (0,5 ml/ 1,5ml/ 2ml) | Sarstedt (Nümbrecht) |

3 Methoden

3.1 DNA-Herstellung

3.1.1 RT-PCR: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Um ein Gen mittels PCR vervielfältigen zu können, muss es in DNA-Form vorliegen. Das ist notwendig da DNA-Polymerasen DNA-abhängig sind und so etwa vorliegende RNA nicht durch sie amplifiziert werden kann. Man schreibt zunächst RNA mithilfe einer Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase,) in cDNA um. Anschließend kann eine PCR durchgeführt werden. Die RT-PCR wurde nach Herstellerangaben für das Takara High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit durchgeführt. Eingesetzt wurden:

| | |
|--|--------|
| Template RNA | 8 µl |
| Primer A | 2 µl |
| Primer B | 2 µl |
| Rnase-freies Wasser | 2,5 µl |
| mixen, zentrifugieren, bei 65°C 5 min inkubieren, auf Eis lagern | |
| 5xreaction buffer | 4 µl |
| Ribolock Rnase-Inhibitor | 0,5 µl |
| dNTPMix | 2 µl |
| Revert Aid Reverse Transkriptase | 1 µl |
| Vorgehen: mixen, 10 min bei 30°C, 30 min.bei 42°C inkubieren, Reaktion beenden: 70°C für 15 min, danach auf Eis lagern | |

Es folgte die Amplifikation mittels PCR mit dem Qiagen® Hot-Star PCR-Kit.

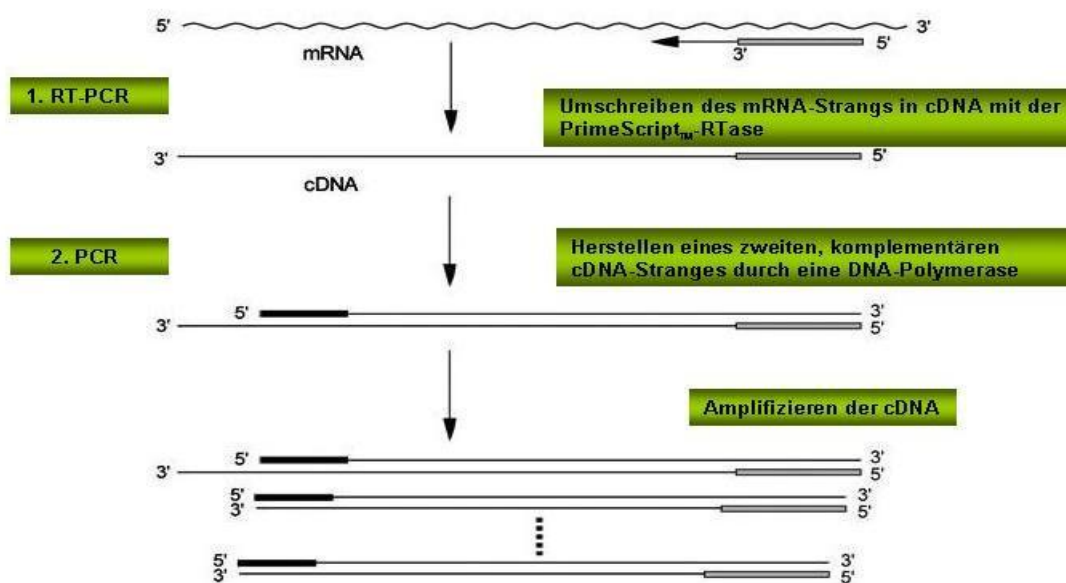


Abbildung 15: Prinzip der RT-PCR zur Herstellung von cDNA aus mRNA (mod. nach Principle of High Fidelity PrimeScript RT-PCR Kit, Takara Protocol)

3.1.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wird durchgeführt, um ein bestimmtes DNA-Template zu vervielfachen. Dazu benötigt man kurze DNA-Abschnitte mit bekannter Sequenz, sogenannte Oligonukleotide, um die Reaktion zu initiieren. Des Weiteren benötigt man eine thermostabile DNA-Polymerase und freie Desoxynukleotide (dNTP's). In drei verschiedenen Temperaturschritten wird die DNA vervielfacht. Mit dem Denaturierungsschritt trennt man die doppelsträngige template-DNA zunächst in zwei zueinander komplementäre Einzelstränge. Dann folgt das annealing, die Phase in der an jeden Einzelstrang je ein Primer bindet. Die Elongation sorgt als dritter Schritt für die komplementäre Auffüllung der beiden Einzelstränge mit freien dNTP's ab den Oligonukleotiden in 5'-3'-Richtung. Es entstehen zwei identische DNA-Doppelstränge, die in weiter folgenden Zyklen nach dem gleichen Prinzip exponentiell vervielfältigt werden können.

Standard-PCR: (Takara Prime Star)

| Komponenten | Menge |
|-----------------------|--------|
| H ₂ O | 31 µl |
| 5x Puffer | 10 µl |
| dNTP | 4 µl |
| Primer 1 | 1,5 µl |
| Primer 2 | 1,5 µl |
| cDNA | 1,5 ng |
| Polymerase Prime Star | 0,5 µl |
| ergibt: | 50 µl |

Standard-Protokoll:

| Schritt | Temperatur | Zeit | Zyklenzahl |
|------------------------|------------|---------|------------|
| Initiale Denaturierung | 94°C | 1 min. | 1 x |
| Denaturierung | 95°C | 1 min. | 35 x |
| Annealing | 58-68°C | 15 s | 35 x |
| Elongation | 72°C | 1 min. | 35 x |
| Final Extension | 72°C | 10 min. | 1 x |
| Hold | 10°C | 10 min. | 1 x |

3.2 Klonierung

Ein großer Teil der Arbeit bestand darin sFLt-1 in verschiedenen Plasmide zu klonieren. Vor Darstellung der einzelnen Klonierungsschritte zeigt Abbildung 15 eine kurze Abfolge einer Klonierung. Um ein Gen beliebig oft vervielfältigen zu können, muss man diese zunächst in einen Klonierungs- oder Expressionsvektor integrieren. Dafür müssen sowohl das Plasmid als auch die zu integrierende DNA mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden, damit sie zueinander komplementäre Enden besitzen. Mittels Gelelektrophorese wird überprüft, ob die durch den Restriktionsverdau entstandenen Fragmente die korrekte Größe besitzen. Wenn das der Fall ist, werden

verschiedene Ligationsansätze pipettiert. Die zugegebene Ligase sorgt dafür, dass das Insert, also die Fremd-DNA, in das geöffnete Plasmid eingebaut wird. So entsteht die rekombinante Plasmid-DNA, die nun in elektrokompente Bakterien mittels Elektroporation transformiert wird. Der Transformationsansatz wird auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert. So kann die DNA in den Bakterien, durch ihr schnelles Wachstum, stark vervielfacht werden. Am darauffolgenden Tag isoliert man die Plasmid-DNA mit einer Miniprep. Es erfolgt ein Restriktionsverdau und eine Gelelektrophorese, die Klone mit den richtigen Fragmentgrößen werden in ihrer Größe bestimmt und eine Sequenzierung durchgeführt. Um genug Ausgangsmaterial für folgende Transfektionen zu erhalten werden größere DNA-Mengen mit einer Maxiprep isoliert.

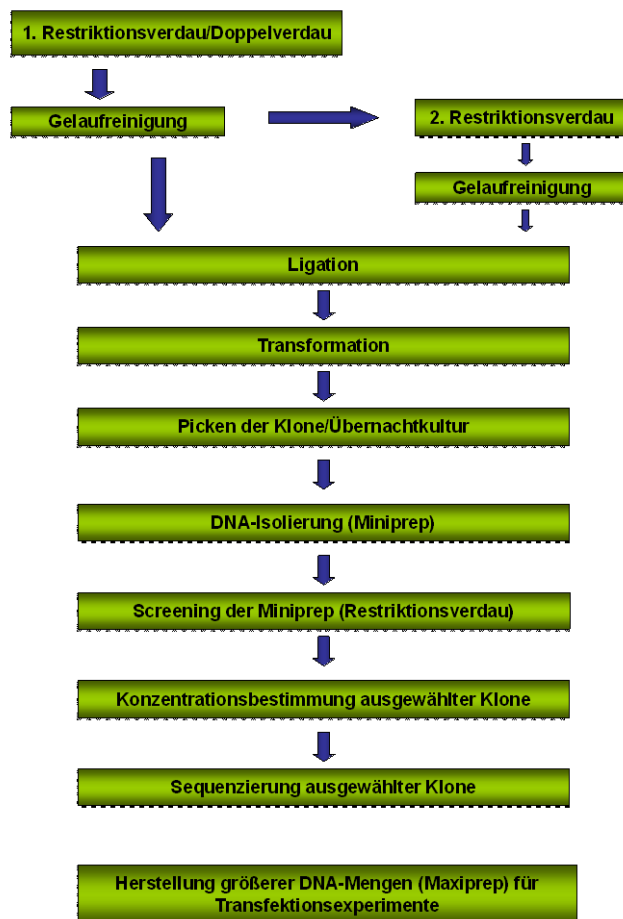


Abbildung 16: Ablauf der Klonierung

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde eine *E.coli*-Übernachtskulturen angelegt. In 5 ml-LB-Medium und 34,5 µg/ml Ampicillin wurde jeweils ein zu überprüfender Klon, zuvor mit steriler Pipettenspitze gepickt, ca. 16h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Herstellerprotokoll im Mini-, Midi- oder Maximaßstab der unter Kapitel 2.5 aufgelisteten Plasmid-Isolations-Kits isoliert. Es wurden ausschließlich die in den genannten Kits vorhandenen Puffer verwendet. Die gewonnene DNA wurde in 30µl dest.H₂O eluiert. Anschließend erfolgte eine DNA- Konzentrationsmessung.

3.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Als Grundlage der photometrischen Konzentrationsbestimmung der DNA diene das Lambert-Beer'sche Gesetz. Laut diesem ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zur Absorption bzw. Extinktion. Mit einem Photometer wurde die Absorption (OD260) der Proben in Quarzglasküvetten bei 260 nm und somit die DNA-Konzentration gemessen. Die DNA wurde verdünnt um die Absorption auf einen Wert zwischen 0,1 und 1,0 einzustellen. Dies ist wichtig, da durch den nichtlinearen Verlauf der Standardkurve ober- und unterhalb dieser Werte starke Abweichungen in den Messungen auftreten können. Um die Reinheit zu bestimmen, wurden die Absorptionen bei 280 nm und 260 nm gemessen und der Quotient (E260/E280) daraus berechnet (1,8 für reine DNA).

Lambert-Beer'sches Gesetz: $E = \log I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$

| | |
|----------------|--|
| E | gemessene Extinktion (Absorption) |
| I ₀ | Intensität des eintretenden Lichtstrahls |
| I | Intensität des nach Durchgang durch die Probe austretenden Lichtes |
| c | Konzentration der absorbierenden Substanz |
| d | Schichtdicke der Küvette |
| ε | molarer Extinktionskoeffizient |

3.2.3 Enzymatische Hydrolyse (Restriktion)

Die benutzten Restriktionsenzyme (siehe Kapitel 2.6) wurden in den dafür vorgesehenen Puffern, nach Angaben des Herstellers, verwendet. Es wurde die vollständige Aktivität beider Enzyme beim Doppelverdau beachtet. Für die nachfolgende Ligation wurden die Enzyme hitzeinaktiviert.

Doppelverdau:

| | |
|------------------------|------------|
| Plasmid | 100-300 ng |
| Enzym 1 | 20 U |
| Enzym 2 | 20 U |
| 10x Puffer | 1ml (1x) |
| H ₂ O dest. | ad 10 µl |

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau der Größe nach aufzutrennen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Um ein 1%iges Agarosegel herzustellen, wurden 50ml 1x TBE-Puffer (121,14 g/L Tris; 51,33 g/L Borsäure; 2,92 g/L EDTA*2 Na*2H₂O) zusammen mit 0,5g Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht. Der verdampfte Anteil wurde wieder mit aqua dest. auf den Ausgangswert aufgefüllt. Die Lösung wurde auf ca. 42°C abgekühlt, dann wurden ihr 2-5µl 1%-iger Ethidiumbromidlösung zugegeben und gemischt. Das Gel wurde in eine Elektrophorese Kammer gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Nach ca.15 min. war das Gel auspolymerisiert und wurde in die Elektrophorese Apparatur gesetzt, mit 1x TBE-Puffer übergossen und der Kamm wurde entfernt. Nachdem ca. 5µl der zu untersuchenden Proben mit 1-5 µl DNA-Loading Dye versetzt und zusammen mit ca. 3µl des 1kb DNA-Größenstandard (siehe Kapitel: 2.7, Abb.6a) auf das Gel aufgetragen wurden, erfolgte die Elektrophorese bei 100 V über eine Stunde. Danach wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Leuchttisch mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm dargestellt.

3.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Gewünschte Banden eines DNA-Fragmentes wurde auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und ausgestanzt. Anschließend wurde die DNA mit dem Gel-Extraktions-Kits (Nucleo Spin® Plasmid Kit), nach Herstelleranleitung, aus dem Agarosegel isoliert. Nach der Elution in NE-Puffer wurde die Konzentration photometrisch gemessen.

3.2.6 Dephosphorylieren von DNA

Um die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation des geschnittenen Vektors zu reduzieren, wurden vor der Ligation die 5'-Phosphat-Gruppen der DNA entfernt. Dafür wurde die Antarktische Phosphatase 15 min. lang bei 37°C inkubiert und danach bei 65°C 20 min. hitzeinaktiviert.

| | |
|------------------------|--------------|
| DNA (hydrolysiert) | 1 µg |
| Antartic Phosphatase | 1 µl |
| 10x Puffer | 1fach 1,5 µl |
| H ₂ O dest. | ad 15 µl |

3.2.7 Ligation mit der T4-DNA Ligase

Vor der Klonierung wurde der Vektor geschnitten und gereinigt. Dann wurden der Vektor und das gewünschte DNA-Fragment verdaut (siehe Kapitel: 3.2.3). Die Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt (siehe Kapitel: 3.2.2). In einem 20 µl-Ansatz mit 4 µl 5xT4-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U) wurde Insert zu Vektor in, nach unten stehender Formel, berechnetem Verhältnis eingesetzt. Nach der Inkubation von 60 min. bei Raumtemperatur wurde die Ligase bei 70°C für 20 min. inaktiviert.

Insert [ng]=3*Vektor[ng]*Länge Insert [bp] / Länge Vektor [bp]

3.2.8 Herstellung elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Um elektrokompente *E.coli*-Zellen herzustellen [Mühlhardt 2000] wurden 5 µl Zellen eines Glycerinstocks über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 100 ml vorgewärmtes LB-Medium + 250 µl Antibiotikum (Tetracyclin 100mg/ml, Endkonzentration: 10µg/ml) mit 2 ml der Übernacht-Kultur beimpft. Diese Hauptkultur wurde etwa 2h bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert, bis die optische Dichte OD600 = 0,5–0,7 betrug. Nachdem diese optische Dichte erreicht wurde, wurde die Bakterienkultur sofort für 30 min. auf Eis gelagert und danach für 5 min. bei 4°C und 5.100 g zentrifugiert. Das Sediment wurde vorsichtig in 50 ml kalter 1 mM HEPES-Lösung (0,23 g/L) resuspendiert und für 5 min. bei 4°C und 5.100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und

verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 25 ml kalter 1 mM HEPES-Lösung wiederholt. Anschließend wurde das Sediment zuerst in 10 ml und dann in 5 ml 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und jeweils für 5 min. bei 4°C und 5.100 g zentrifugiert. Bei jedem Schritt wurde der Überstand verworfen. Das Sediment wurde vorsichtig in 1 ml 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und frisch für die Transformation eingesetzt. Die restlichen Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.9 Transformation elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Ca. 2µl Ligationsansatz aus Kapitel 3.2.7 wurden zu 50 µl frischen, kompetenten *E. coli*-Zellen pipettiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde ohne Luftblasen in spezielle Elektroporationsküvetten pipettiert. Bei 2000 V mit 5 ms wurde mit dem Multiporator ein elektrisches Feld erzeugt und so transformiert. Nach dem Puls wurden die transformierten Zellen mit 800µl vorgewärmtem LB-Medium aus der Küvette gespült. Anschließend wurde die Suspension in einem Eppendorf-Tube 1h bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. 75µl des regenerierten Transformationsansatzes wurden auf vorgewärmten LB-Amp-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA Sequenzierungen wurden extern durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Der Sequenzierungsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

| | |
|------------------------|--------|
| Plasmid | 700 ng |
| Primer | 2µl |
| H ₂ O dest. | x µl |
| gesamt | 7 µl |

3.2.11 Anlegen von Glycerin-Stocks

Für die langjährige Lagerung der *E.coli*-Klone, wurden zu 1 ml Glycerin je 1 ml der jeweiligen LB-Flüssigkultur gegeben, gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Klone werden bei -80°C gelagert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden ausnahmslos an einer zuvor desinfizierten Sterilbank (Laminar Flow, Fisher Scientific) durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 5-6 ml DMEM-Medium (1% Pen/Strep (v/v), 10% FKS (v/v), 200 mg/l Calciumchlorid und 4 mM L-Glutamin) in Zellkulturflaschen im Brutschrank (37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Um die adhärent wachsenden Zellen zu Passagieren, wurde das Medium mit sterilen Glaspipetten abgenommen, dann wurden die Zellen mit 5-6 ml PBS einmal gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin-EDTA für 2-5 min. inkubiert. Es wurden 7,5 ml Medium hinzugefügt und neue Kulturschalen mit einem ml dieser Suspension beimpft. Nach der Überführung von ca. 1×10^6 Zellen in eine neue Zellkulturflasche wurden 5-6 ml Medium dazugegeben und im Brutschrank bei gleichen Bedingungen (s.o.) inkubiert.

3.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Zelllinien wurden zur Aufbewahrung eingefroren. Das Medium wurde mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt und die Zellen für 2-5 min. im Brutschrank mit 5-6 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Danach wurden 10 ml Medium auf die abgelösten Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und für 10 min. bei 125 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Einfriermedium resuspendiert und anschließend auf Kryotubes aufgeteilt (je 1 ml). Die Kryotubes wurden für 24 h in -80°C kaltem Isopropanol und danach bei -196°C in flüssigen Stickstoff gelagert.

3.3.3 Auftauen von Zellen

Die benötigten Kryotubes wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 5-6 ml DMEM-Medium resuspendiert. Alles wurde in eine Kulturflasche überführt und geschwenkt um die Zellen auf der Oberfläche zu verteilen.

3.3.4 Auszählen von Zellen

Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer-improved bestimmt. Man ermittelt mit der Zählkammer die Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit. Die Grundplatte der Zählkammer hat eine Kammertiefe von 0,1 mm, in den Kammerboden ist ein Zählnetz eingraviert. Das Zählnetz besteht aus 4 (L-) Quadraten, diese wiederum aus 4x4 kleinen Quadraten. Jedes der 4 L-Quadrate ist 1x1 mm groß und entspricht vom Volumen her 0,1 µl. Nachdem ein Deckglas aufgelegt wurde, pipettiert man die verdünnte Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammer (Verdünnung

1:2 mit Medium). Dann wurden alle 4 L-Quadrate ausgezählt und die Zellzahl berechnet mit folgender Formel:

$$[(L1+L2+L3+L4) :4] = x V \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

L= L-Quadrat

V= Verdünnungsfaktor (hier: 2)

3.3.5 Transfektion

Transfektion ist das Einbringen einer gewünschten Plasmid-DNA in verschiedene eukaryotische Zelllinien. Um die Zellmembran überwinden zu können sind pH-Wert, die Zelldichte und die DNA Konzentration sowie die Temperatur der Reagenzien (RT) wichtige Faktoren. Es gibt verschieden chemische und physikalische Methoden, für die vorliegende Dissertation wurde die Lipofektion genutzt.

3.3.6 Lipofektion

Das Prinzip der Lipofektion ist das Bilden von DNA-Liposomen Komplexen, die durch ihre lipophile Eigenschaft leicht mit der Zellmembran fusionieren können und so die DNA ins Zytoplasma gelangt (Felgner 1987). Die Zellen (HEK 293), mit 60-80%iger Konfluenz, wurden einen Tag vor der Transfektion mit einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ auf 6-Well Platten überführt. Pro well wurden 2ml DMEM-Medium zugegeben und die Zellen für 24 h inkubiert.

Vor der eigentlichen Transfektion wurde das Medium gewechselt. Es wurden pro Ansatz 4 µg DNA zu 500 µl DMEM-Medium (ohne FKS) gegeben, dann kamen 7,5 µl PLUS-Reagent dazu, Alles wurde nach kurzem vortexen 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 22,5 µl Lipofectamine LTX TM Reagent hinzugegeben, gevortext und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNA-Lipid-Komplex wurde tropfenweise auf die Zellen und die 6-Well-Platten gegeben. bei 50-80 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden für weitere 24-48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzmikroskopie zur Darstellung GFP exprimierender Zellen als Transfektionskontrolle.

3.3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Verfahren der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient zur indirekten Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Da die meisten Proteine an SDS in einem konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis binden, wandert dieser negativ geladene SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Die SDS-PAGE wurde unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in 1 mm starken Vertikalgelen durchgeführt. Die Platten wurden mit Ethanol abs. gereinigt und zusammengesteckt, danach wurde das 10%ige Trenngel bis zur Markierung gegossen und mit Ethanol bis zur Glaskante aufgefüllt. Etwa 30 min. später wurde mit aqua dest. der Ethanol vom polymerisierten Gel gewaschen und getrocknet. Auf das Trenngel wurde das 4%ige Sammelgel gegeben und in dieses der Kamm ohne Luftblasen gesteckt. 100µl der Proben wurden zusammen mit 25 µl nicht-reduz. SDS-Probenpuffer (Rotiload) 10 min. bei 94°C erhitzt. Die Proben und 15 µl des Proteinstandards (Spectra broad range) wurden in die Geltaschen pipettiert. Die aufgetrennten Proteine konnten danach mittels einer Coomassie-Blue oder Silberfärbung sichtbar gemacht oder durch Western-Blot auf eine Membran übertragen werden.

Mischtabelle Biometra Multigel

| | Trenngel (25 ml) | Sammelgel (10 ml) |
|--|------------------|-------------------|
| Polyacrylamid | 10% | 4% |
| 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8 | 6,25 ml | - |
| 0,5 M Tris/HCl; pH 6,8 | - | 5,0 ml |
| 20% SDS-Stock | 125 µl | 50 µl |
| 30% Acrylamidlösung (Rothiphoese Gel 30) | 9,00 ml | 2,2 ml |
| H ₂ O dest. | 9,75 | 2,8 |
| 10% APS-Stock | 20 µl | 15 µl |
| TEMED | 200 µl | 100 µl |

APS und TEMED wurden kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben.

3.3.8 Coomassie-Färbung

Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE (siehe Kapitel: 3.6) mit Page Blue angefärbt und somit auf den Gelen sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele ca. 2 h oder über Nacht in dem Farbstoff geschwenkt. Farbrückstände wurden nach der Färbung mit der Coomassie-Entfärbelösung bis zum gewünschten Kontrast wieder entfärbt. Danach konnten die Gele auf dem Gelrockner für 90 min. bei 80°C getrocknet werden.

3.4 Western-Blot

Um die Proteine nach der Auftrennung durch die SDS-Page auf eine Protran-Nitrozellulose-Membran zu übertragen, wurde das Semi-Dry-Blotting-Verfahren mit dem Fastblot angewandt. Im nachfolgenden Schema ist der Aufbau des Blots beschrieben. Das Filterpapier wurde in WB-Transferpuffer getränkt und der Blot nach dem folgenden Schema aufgebaut:

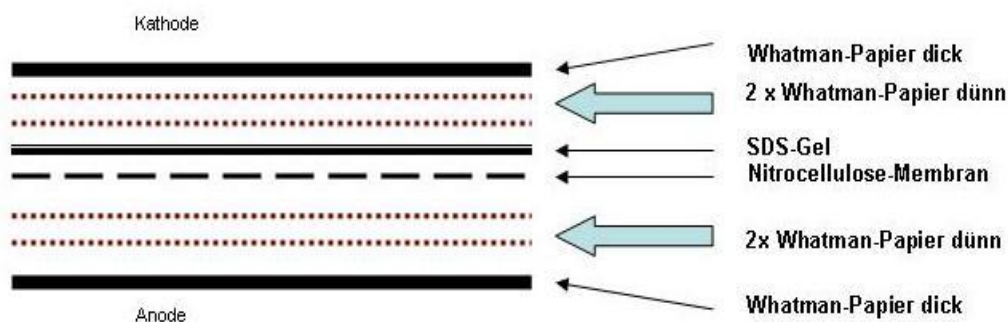


Abbildung 17: Semi Dry-Blot Aufbau

Die Proteine wurden bei 60mA 60 min. lang auf die Nitrocellulose-Membran übertragen.

3.4.1 Ponceau Rot-Färbung

Um die Blot-Effizienz zu überprüfen und um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurde die Protran-Nitrozellulose-Membran 5 min in Ponceau-Rot geschwenkt. Nach der Entfärbung mit dest.H₂O waren Banden sichtbar.

3.4.2 Detektion mit Antikörpern

Um bestimmte Proteine auf der Nitrozellulose-Membran sichtbar zu machen, werden sie mit einem Primär- und einem Sekundärantikörper inkubiert. Der primäre Antikörper Anti-VEGF Rezeptor 1 [Y103] bindet spezifisch an das Antigen sFlt-1. Der sekundäre Antikörper, zuvor mit einem Enzym, meist der Alkalische Phosphatase (AP) oder der Meerrettichperoxidase (HRP) markiert, bindet wiederum an den primären Antikörper. Das Enzym katalysiert eine Reaktion, die den Nachweis für das Vorhandensein des Antigens liefert.

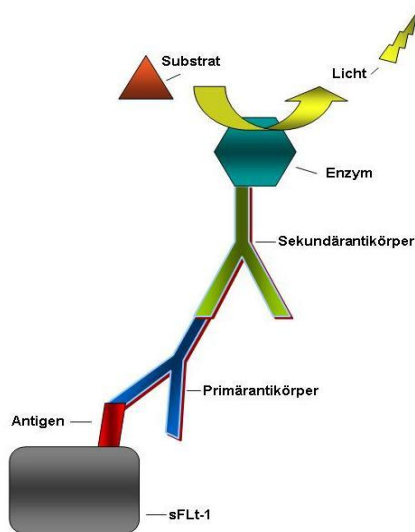


Abbildung 18: Detektionsprinzip mit spezifischen Antikörpern

3.4.3 Immundetektion mit anti-HIS tag Antikörper

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Nitrozellulose-Membran für 1 h oder über Nacht bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer geschwenkt. Die Membran wurde 3x 10 min. in TBS-Tween und 1x in TBS gewaschen. Danach wurde sie über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper anti Flt-1 (Fitzgerald), in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Der Rabbit anti-mouse IgA-Antikörper (SIGMA) wurde ebenfalls 1: 1000 in 10ml Blockingpuffer verdünnt. Nach je 3 Waschschritten für 10 min. mit TBS-T und einem Schritt für 10 min. mit TBS wurde mit dem Western-Blotting Detection-Kit (3 ml Lösung A + 3 ml Lösung B) für 1 min. bei Raumtemperatur detektiert. Bevor die Membran in Frischhaltefolie gelegt und anschließend in die Röntgenkassette geklebt wurde, musste die Detektionslösung wieder entfernt werden. Zunächst wurde ein Film nach 3 min., dann nach 30 min. entwickelt.

3.5 HUVEC Migrationsassay

Der HUVEC Migrationsassay stellt die geeignete Methode für die Aktivitätsmessung von anti-VEGF Molekülen dar, weil man durch ihn sichtbar machen kann, dass die Endothelzellen auf Grundlage von chemischen Signalen proliferieren und migrieren und VEGF-Inhibitoren das Wachstum der Zellen bremsen kann.

Die HUVEC's wurden in 24-well Platten in endothelialem Zell-Medium M200 +LSGS bis zur Konfluenz ausplattiert. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein zellfreies Areal in der Zellschicht geschaffen. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS Puffer wurde endotheliales Zell-Medium M200 (2%v/v FBS, 1µg/ml hydrocortisone, gentamycine, amphotericine) mit zusätzlich 10 ng/ml von rekombinantem, humanem VEGF zu den Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des VEGF-Inhibitors sFlt-1 gegeben. Die Platten wurden bei 37°C und 5%CO₂ für 24h inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Abstände der Zellmigration mithilfe des Keyence BioZero BZ-8000 an drei verschiedenen Stellen in zwei unterschiedlichen Experimenten gemessen. Die Inhibition der HUVEC-Migration wurde als Funktion der VEGF-Inhibitor Konzentration im statistischen Test als two-tailed P-value dargestellt.

3.6 Statistische Auswertung des HUVEC Migrationsassay

Die Vergleiche der Mittelwerte wurden mit Hilfe des „students paired t- test“ durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 ($P < 0,05$) wurden als statistisch signifikant erachtet. Die statistische Analyse wurde mit der Software SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc.) berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl der verschiedenen Isoformen von sFLT-1 (NCBI)

Die genetischen Sequenzen für sFlt-1 wurden beim National Center for Biotechnology Information (NCBI) herausgesucht. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, gibt es 4 bisher bekannte Isoformen von sFLT-1. Die Varianten 2,3 und 4 unterscheiden sich in der für das 3' Ende kodierenden Sequenz von der membranständigen Isoform 1 und liegen somit als lösliche Form vor. In dieser Arbeit wurde die Isoform 1 isoliert, die in der Cornea für die Avaskularität sorgt.

4.2 Design Primer für sFlt-1

Die Strategie zur Herstellung von sFlt-1 cDNA bestand darin, den vollständigen Klon in 2 Teilen (5' Anteil und 3'-Anteil) aus der mRNA zu isolieren (Abb. 19). Hierfür wurden 2 Primerpaare benötigt.

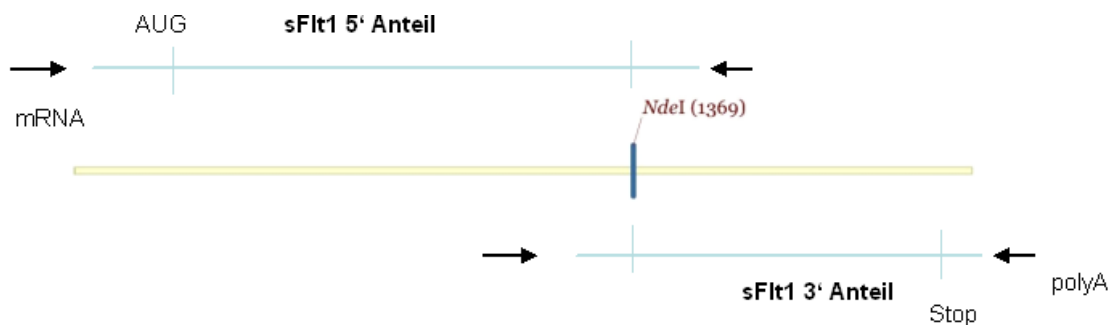


Abbildung 19: Herstellung der sFlt-1 mRNA

Darstellung der Strategie das gesamte sFlt-1 aus dem 5' Anteil und dem 3' Anteil herzustellen. Beide Anteile haben eine NdeI Schnittstelle.

4.3 RT-PCR

Aus dem Labor für molekulare Ophthalmologie Regensburg lag bereits corneale RNA vor, die als Ausgangsmaterial für diese Arbeit genutzt werden konnte. Mithilfe der RT-PCR wurde die sFLt-1 RNA in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde eine Gradienten PCR durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die Primer zu bestimmen. Die RT-PCR wurde mit dem RT-PCR-Takara Kit durchgeführt.

4.4 Klonierung

4.4.1 Zweiteilige Klonierung von sFLt-1 in pCR2.1 Topo

Die Klonierung von sFLt-1 in pCR2.1 erfolgte in zwei Schritten wie unter 4.4.2 erklärt.

4.4.2 Fusion der beiden Teile (3' und 5')

Zunächst wurden die einzelnen PCR Fragmente des 5' und 3' Anteils in pCR2.1 TOPO Plasmide via TOPO Klonierung eingeführt. Somit waren die Ausgangsplasmide für den zweiten Schritt vorhanden (Abb. 20 A). Im zweiten Schritt wurden der 3' und der 5' Anteil fusioniert. Durch die gemeinsame NdeI I Schnittstelle entstand aus dem 5' und dem 3' Anteil das komplette sFLt-1. Dazu wurde der 5' Anteil mit den Schnittstellen BamHI und NdeI I aus dem Vektor herausgeschnitten. Der unerwünschte Backbone wurde mit PvuII in 5 Fragmente zerschnitten, um die Wahrscheinlichkeit der richtigen Ligation von 3' und 5' Anteil zu erhöhen. Der 3'-Anteil wurde mit NdeI und BamHI geschnitten, der restliche Teil des Inserts wurde mit NheI zerschnitten. Vor der Ligation wurde der Verdau nochmals auf ein Gel aufgetragen und überprüft (Abb. 20 B). Die Fragmente des 3'-Anteils hatten eine erwartete Größe von 5268bp ("kbBackbone" mit 3' Anteil) sowie 189bp und 115bp für den Rest, während die Fragmente des 5'-Anteils die Größen 2433bp, 717bp, 360bp, 218bp und 197bp (alle Rest) und 806bp für den 5' Anteil des sFLt1 aufwiesen.

Mit einem Restriktionsverdau wurde die korrekte Klonierung überprüft (Abb. 20 C). Das Insert sFLt-1 hat nach dem Verdau mit EcoRI I eine Größe von 2161bp. Von den Klonen 2 und 4 wurde eine Midiprep durchgeführt und die DNA Sequenz des Plasmids im Bereich der Klonierung durch SeqLab Göttingen per Sequenzierung überprüft.

Das Plasmid pCR2.1 sFLt-1 dient als Ausgangsplasmid für alle weitere Klonierungen.

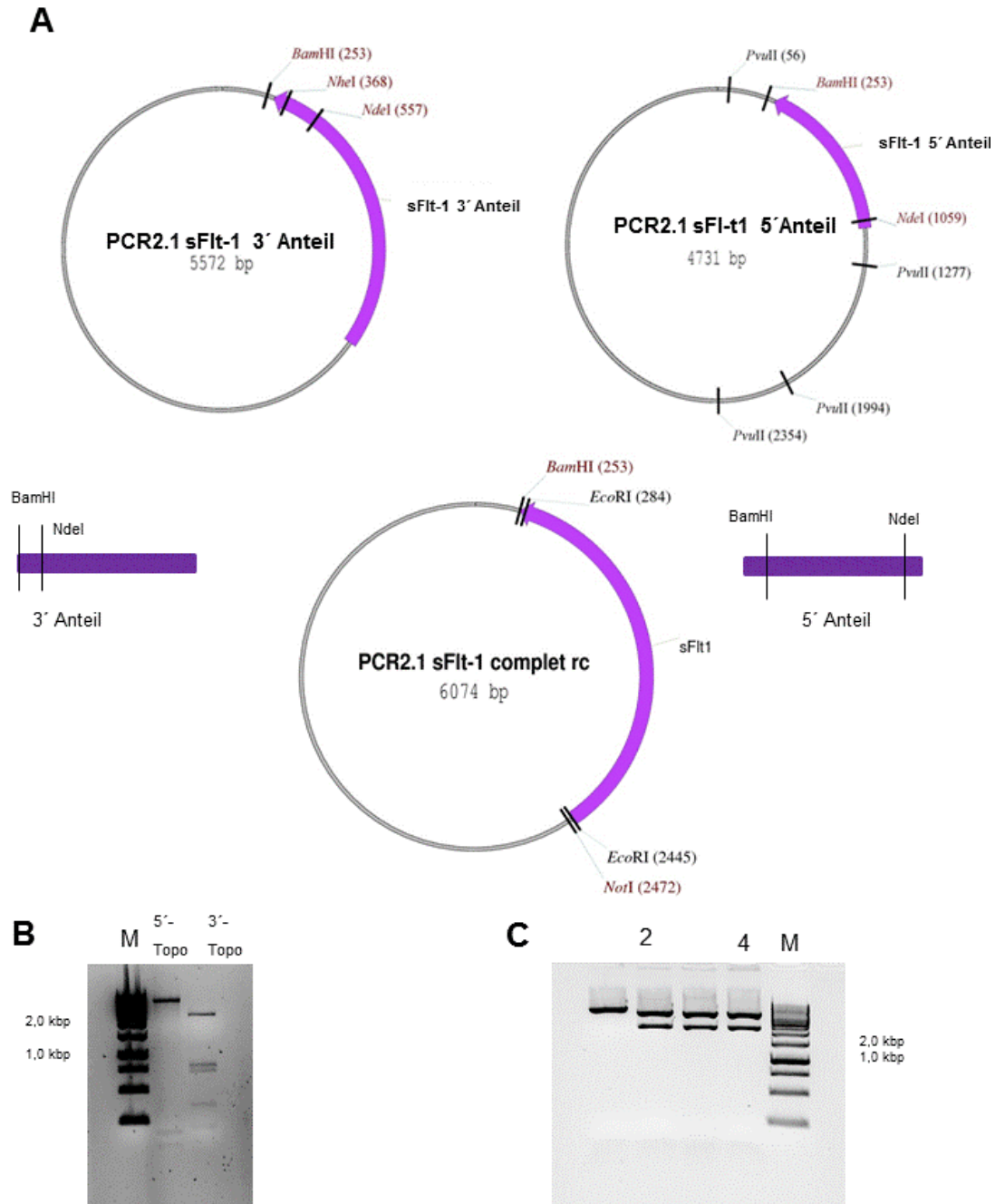


Abbildung 20: Zweiteilige Klonierung von sFlt-1

(A) (oben) Darstellung der pCR2.1 TOPO Plasmide mit den Anteilen 3' und 5' des sFlt1. Der Backbone des 5'Anteils und Insert des 3'Anteils wurden zerschnitten. (unten) Darstellung des gesamten sFlt1 im pCR2.1 TOPO Plasmid. (B) Gelelektrophorese der Plasmide nach Verdau mit den Restriktionsenzymen BamHI, NdeI und PvuII (Marker Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Fermentas) (C) Prüfung von Minipreps des Plasmids pCR2.1sFlt-1 durch Restriktionsverdau mit EcoRI. Die erwartete Fragmentgröße war 2,2 kbp

4.4.3 Klonierung von sFLt-1 in pIRES-hrGFP1a

Um später mittels Fluoreszenzmikroskopie eine effiziente Transfektion der Plasmide überprüfen zu können, wurde sFLt-1 in den Vektor pIRES-hrGFP1a, der über das grün fluoreszierende Protein verfügt, kloniert. sFLt-1 wurde mit den Schnittstellen BamHI und Not I aus dem Vektor pCR2.1-sFLt-1 herausgeschnitten und in pIRES-hrGFP1a zwischen CMV-Promotor und IRES kloniert. (Abb. 21A und B).

Die Klonierung wurde mit einem Restriktionsverdau überprüft. Das Insert sFLt-1 hat nach dem Verdau mit EcoRI eine Größe von 2161 bp (Abb. 21 C). Die Klone 1, 11 und 12 wurden ausgewählt und in einem weiteren Verdau mit HincII und PstI überprüft (Abb. 21 D). Erwartete Fragmentgrößen für den HincII Verdau waren: 4214bp, 1741bp, 717bp, 455b. Für den Pst I Verdau wurden die Größen 3826bp, 1641bp, 1020bp, 405bp sowie 289bp erwartet. Nach diesem Verdau wurde von Klon 12 ein Glycerolstock angelegt und eine Sequenzierung von SeqLab Göttingen durchgeführt.

4.4.4 Klonierung von sFLt-1 in pcDNA.3 (+) und Hinzufügen eines

His Tag

Als zweiter Expressionsvektor wurde das Plasmid pCDNA3.1 genutzt. Für diese Klonierung wurde sFLt-1 mit der Schnittstelle EcoRI aus dem pCR2.1-sFLt-1 Vektor herausgeschnitten und in pcDNA3. (+) zwischen T7-Promotor und f1origin kloniert (Abb. 22 A). Zur Überprüfung der korrekten Klonierung wurde pcDNA.3sFLt-1 mit HindIII verdaut (Abb. 22 B). Klon 5 und 22 zeigten die gewünschten Fragmentgrößen 5913 Bp und 1705 Bp, somit wurden von ihnen Glycerolstocks angelegt und eine Sequenzierung von SeqLab Göttingen durchgeführt.

Zum Nachweis der Expression von sFLt-1 mittels Western-Blut wurde eine HIS-Tag Insertion zwischen letztem sFLt1 Codon und STOP-Codon durchgeführt. Dazu war eine Metagenese PCR mit phosphorylierten Primern notwendig (Abb. 22C). Das PCR Produkt wurde ausgeschnitten und mit dem M&N Gel Extraktion Kit aufgereinigt und die Proben gepoolt. Anschließend erfolgte die Ligation und Transformation. Es wurden 24 Klone isoliert und mittels Kontrollverdau mit EcoRI und BmtI geprüft. Die erwarteten Bandengrößen entsprechen bei Klon 3 den Vorhersagen, sodass dieser sequenziert wurde und für weitere Experimente eine Maxiprep angefertigt wurde.

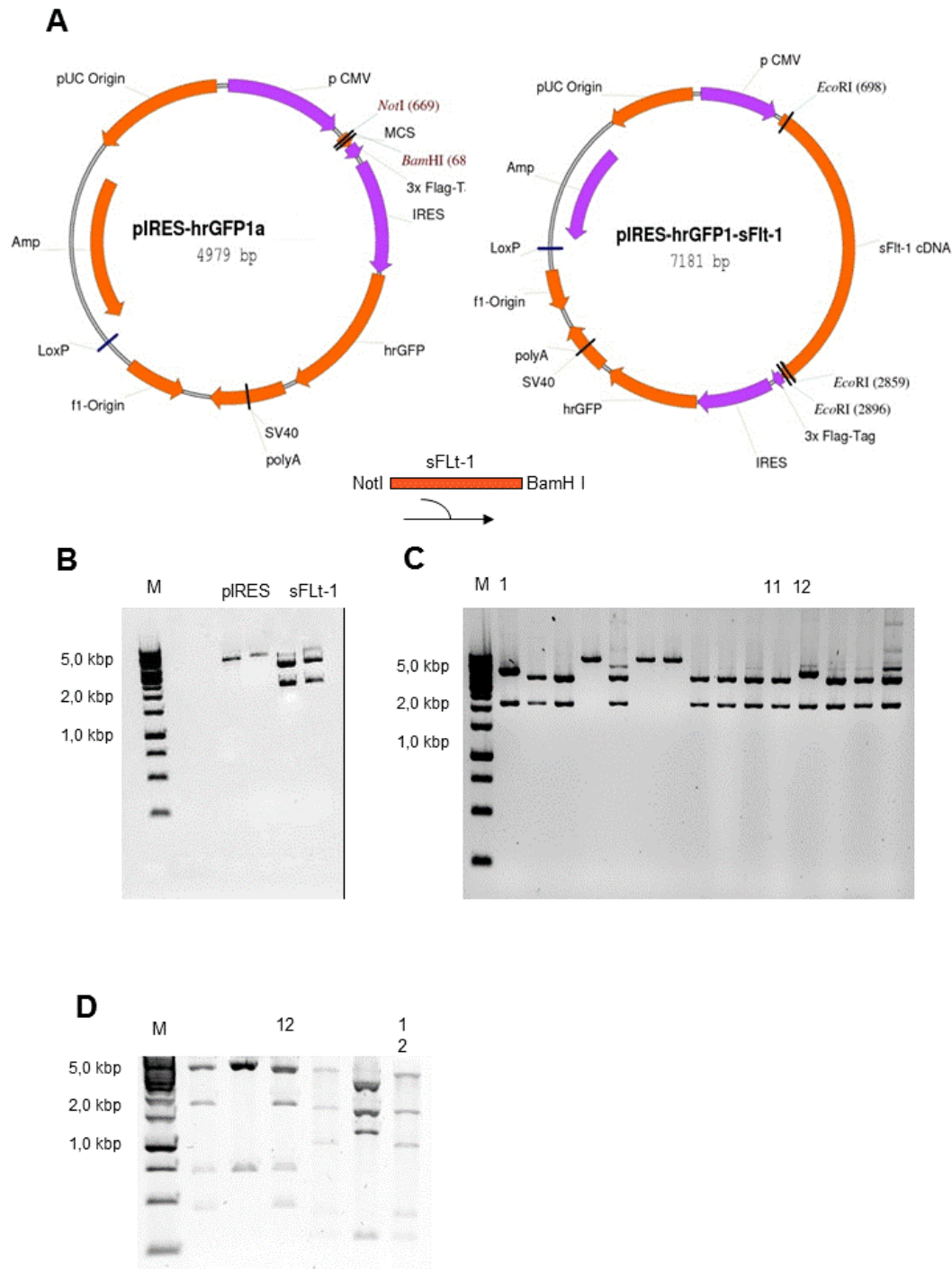


Abbildung 21: Klonierung von pIRES-hrGFP1-sFlt-1

(A) Darstellung der Klonierung von sFlt-1 aus dem Topo pCR2.1 sFlt-1 in das Ausgangsplasmid pIRES-hrGFP1a. Beide Plasmide wurden mit NotI und BamHI verdaut, sFlt-1 fügte sich so an richtiger Stelle in das Ausgangsplasmid. Es entsteht das Plasmid pIRES-hr-GFP-sFlt-1. Amp: Ampicillinresistenz, CMV: Cytomegalievirus Promoter; SV40pA: Polyadenylierungssignal SV40, MCS: multiple cloning site **(B)** Gelelektrophorese der Plasmide nach Verdau mit Restriktionsenzymen. Die Bandengröße von sFlt-1 nach dem Verdau des Plasmids pCR2.1 sFlt-1 mit NotI und BamHI liegt bei 2,16kbp. **(C)** Überprüfung der Klonierung von pIRES-sFlt-1 mit EcoR I auf die korrekte Fragmentgröße des Inserts sFlt-1 mit 2,16kbp. **(D)** Die Klone 1,11 und 12 wurden ausgewählt und in einem weiteren Verdau mit Hinc II und Pst I überprüft. Klon 12 entsprach den Vorhersagen und wurde sequenziert.

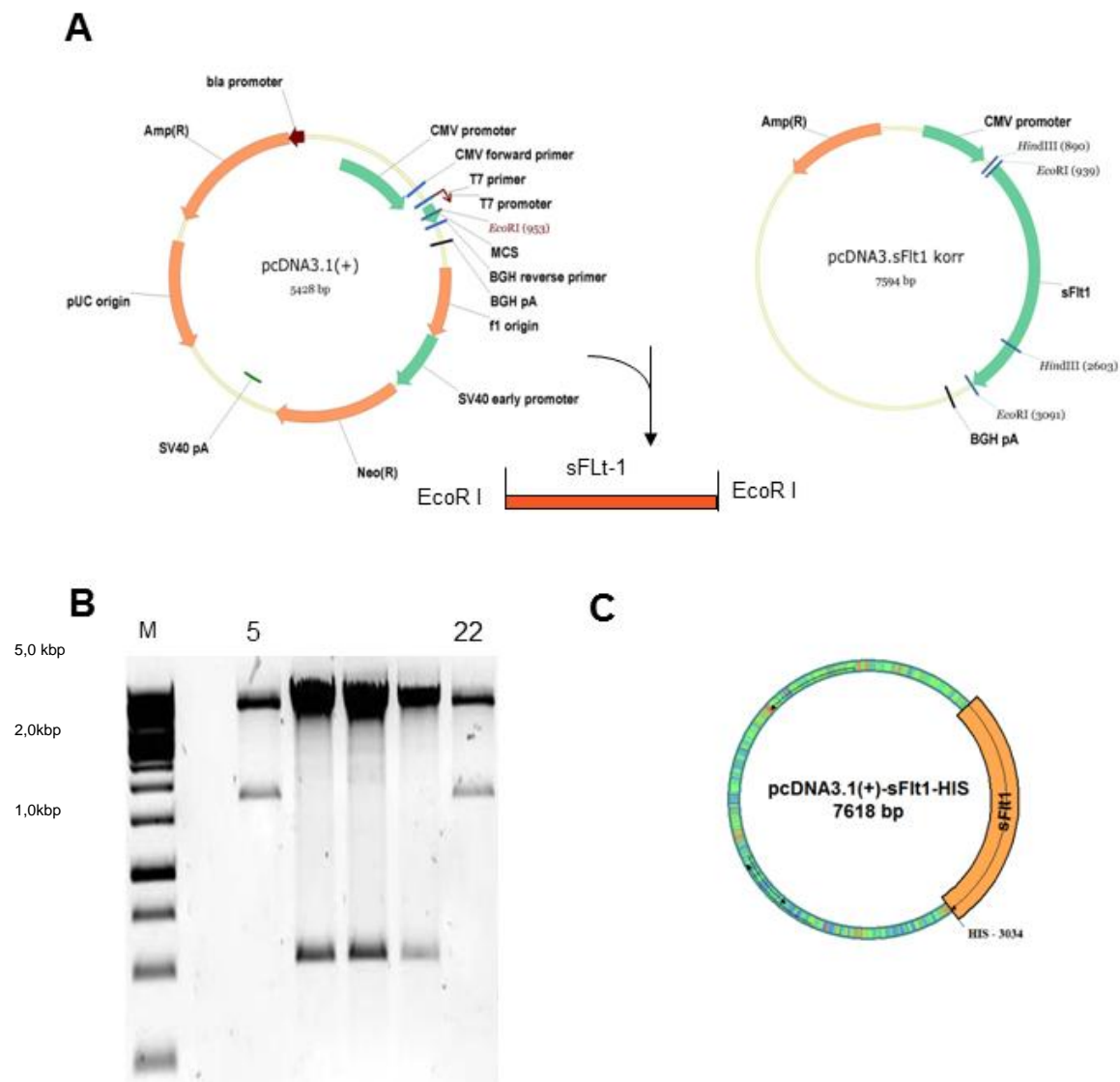


Abbildung 22: Klonierung von pcDNA3.sFLt-1

(A) Darstellung der Klonierung von sFLt-1 aus pCR2.1 sFLt-1 in das Ausgangsplasmid pcDNA3.1(+). Hierzu wurden das Ausgangsplasmid und das Insert sFLt-1 mit EcoRI geschnitten und ligiert. CMV: Cytomegalievirus Promoter; BGH: Bovine Growth Hormon Promotor, SV40pA: Polyadenylierungssignal, bla Promoter: beta lactamase promotor, MCS: multiple cloning site, Schnittstelle: EcoR I (B) Prüfung des sFLt-1 enthaltenden Plasmids pcDNA3.sFLt-1 durch Restriktionsverdau mit Hind III (Marker Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Fermentas). Klon 5 und 22 zeigten die erwarteten Fragmentgrößen und wurden sequenziert und zur Weiterbenutzung bereitgestellt. (C) His Tag mutagenese PCR, Plasmid pcDNA3.1(+)-sFLt1-HIS (7618bp)

4.4.5 Klonierung in SSV9 reguliert

Die SSV9 Plasmide sind die Ausgangsvektoren für die spätere Herstellung der AAV Vektoren, da sie über die für die Verpackung in virale Kapside notwendigen inverted terminal repeats (ITR) verfügen. Das Ausgangsplasmid SSV9-TetOn.Epo wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe retinale Gentherapie des INSERM 1089 Labors in Nantes, Frankreich zur Verfügung gestellt. Es ist 8443bp groß und enthält neben dem Regulationssystem TetOn, bestehend aus der Expressionskassette CAG-rtTA-pA als Reportergen Erythropoetin sowie eine WPRE Sequenz (woodchuck hepatitis post transcriptional regulatory element), (Abb. 23B). Die Sequenz für das sFLt-1 stammt aus dem Plasmid PCR2.1 sFLt-1.

Für die Klonierung von SSV9-TetOn-sFLt-1 waren zwei Schritte notwendig.

Zunächst wurde mittels Mutagenese-PCR die EcoRV Schnittstelle von PCR2.1 sFLt-1 in eine BamHI Schnittstelle umgewandelt (Abb.23A). Anschließend wurde sFLt-1 mit den Schnittstellen BamHI und SpeI aus dem pCR2.1-sFLt-1 Vektor herausgeschnitten (erwartete Größe 2161bp). Aus dem Plasmid SSV9-TetOn.Epo wurde mit den Schnittstellen NheI und BamHI die Sequenzen mEpo und WPRE herausgeschnitten, erwartete Fragmentgrößen waren 7214bp und 623 bp (Abb.22B). Es erfolgte die Ligation (Abb. 23C) und damit die Klonierung von sFLt-1 zwischen TetOn CMV und polyA SV40 (Abb. 23D). Es wurden 12 Klone gepickt und die Plasmid DNA nach Herstellerprotokoll in einer Miniprep isoliert und mit EcoRI (erwartete Größen: 4445bp, 2152bp, 1179bp, 807bp, 786bp), PstI (erwartete Größen: 6631bp, 1641bp, 840bp, 289bp) und SmaI (erwartete Größen: 3683bp, 2757bp, 1910bp, 678bp, 167bp) auf die richtige Fragmentgröße überprüft. Klon 1 wurde als Favorit nochmals einzeln mit den gleichen Enzymen verdaut (Abb. 23E). Die Klone 1, 4, 8 und 12 wurden sequenziert. Da Klon 1 die richtige Sequenz aufwies wurde von ihm ein Glycerolstock angelegt und für weitere Experimente eine Maxiprep angefertigt.

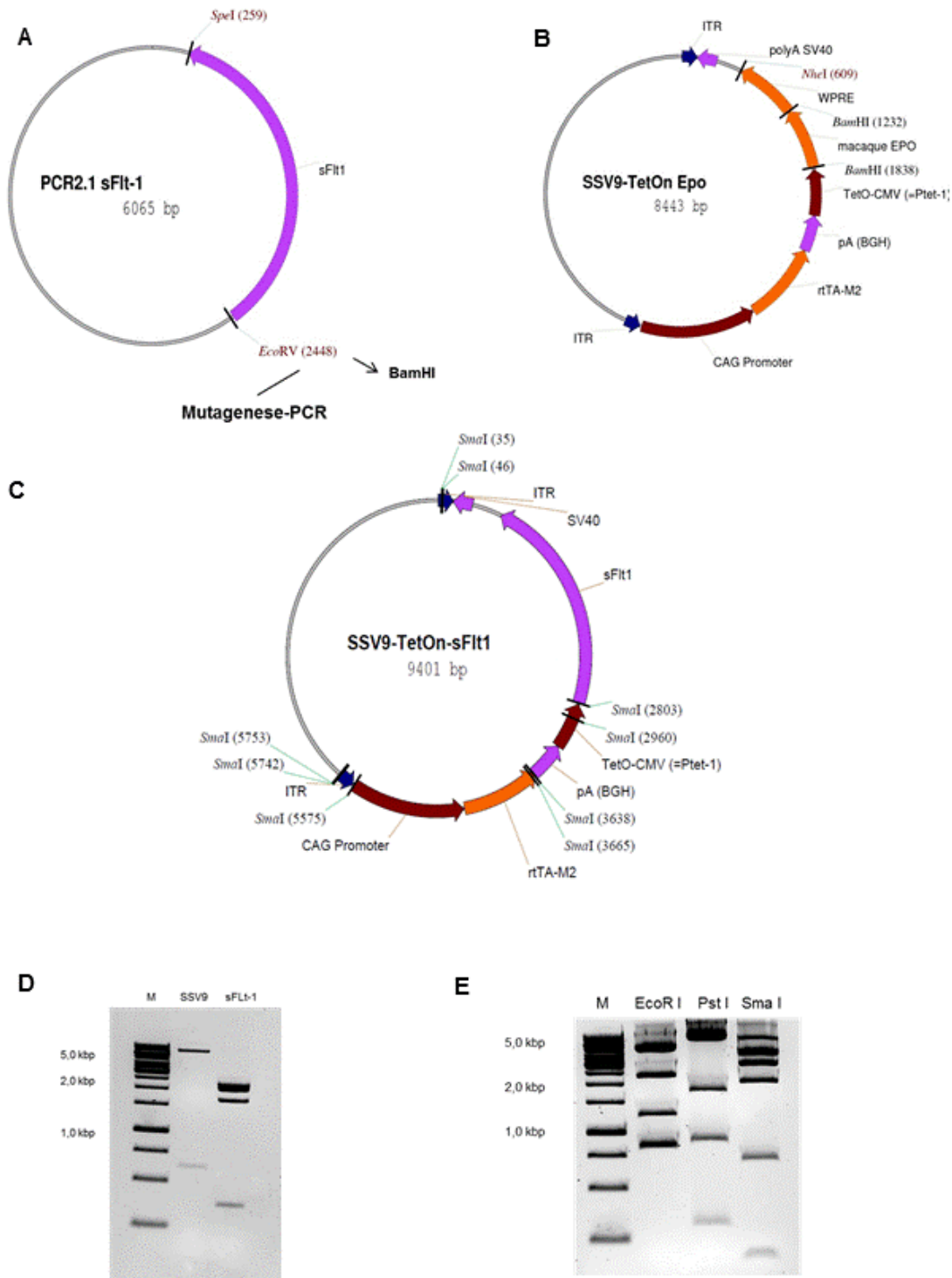


Abbildung 23: Klonierung von SSV9-Tet-On-sFlt-1

(A) Darstellung des Ausgangsplasmids PCR2.1 sFlt-1. Mittels Mutagenese-PCR wurde die *EcoRV* Schnittstelle zu einer *BamHI* Schnittstelle umgewandelt. (B) Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau von SSV9-TetOnEpo mit *NheI* und *BamHI* (C) Darstellung des neu entstandenen Plasmides SSV9 TetOn-sFlt-1. (D) Gelelektrophorese der Plasmide SSV9 TetOn nach Verdau mit *NheI* und *BamHI* mit den erwarteten Fragmentgrößen 7214bp und 623bp sowie PCR2.1 sFlt-1 nach Verdau mit *SpeI* und *BamHI*. Anschließend erfolgte die Ligation. (E) Überprüfung des neu hergestellten Plasmides SSV9-TetOn-sFlt-1 mit *EcoRI*, *PstI* und *SmaI* geschnitten (Marker Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Fermentas)

4.5 In Vitro Expression von sFLt-1

Um sFLt-1 als Protein von eukaryotischen Zellen exprimieren zu lassen, muss zunächst die DNA in die entsprechende Zelllinie eingebracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Lipofektion (3.4.1) durchgeführt. Um die für eine Transfektion benötigten, größeren DNA-Mengen herzustellen wurde die gewünschte DNA im Maxi-Maßstab isoliert. Für die Transfektionsexperimente wurde die HEK 293 Zelllinie genutzt (Abb. 24). Als Positivkontrolle für die korrekte und effiziente Transfektion wurden pIRES-sFLt-1 und peGFP-N1 benutzt, da diese Plasmide das grün fluoreszierende Protein (GFP) enthalten, und somit als erfolgreich transfizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchten. Es wurden standardmäßig 4 µg DNA eingesetzt und in 60-80% konfluenten Zellen in 6-Well Platten transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24-48 Stunden mithilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskopes (Keyence BL8100) dargestellt (Abb.24 A-C). Hierbei zeigte sich, dass die Effizienz in HEK 293 -Zellen bei etwa 80% lag.

4.6 Western-Blot mit his-getagtem sFLt-1

Da der Expressions- und Größennachweis von rekombinantem sFLt-1 nach Transfektion in HEK293 Zellen aufgrund mangelnder geeigneter Antikörper gegen sFLt-1 nicht möglich war, wurde dieser mit dem His-getaggen sFLt-1 Konstrukt durchgeführt. Hierfür wurde 4 µg DNA des entsprechenden pcDNA3.sFLt1-HIS in HEK 293-Zellen transfiziert. Nach etwa 48 Stunden wurde das Kulturmedium abgenommen. Die Aufreinigung des His-getaggen Proteins erfolgte über eine klassische Nickel-NTA Säule. Nach Aufreinigung des Kulturüberstandes über eine solche Säule wurde der Western-Blot durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem anti-His Antikörper (1:5000) bei einer Expositionszeit von 15 min (Abb. 24 D). Man kann gut eine Bande bei etwa 95 kDa erkennen, die der publizierten Größe der sFLt-1 Isoform 1 entspricht. Wir gehen daher davon aus, dass auch in den anderen Expressionskassetten sFLt-1 in der erwarteten Größe exprimiert wird.

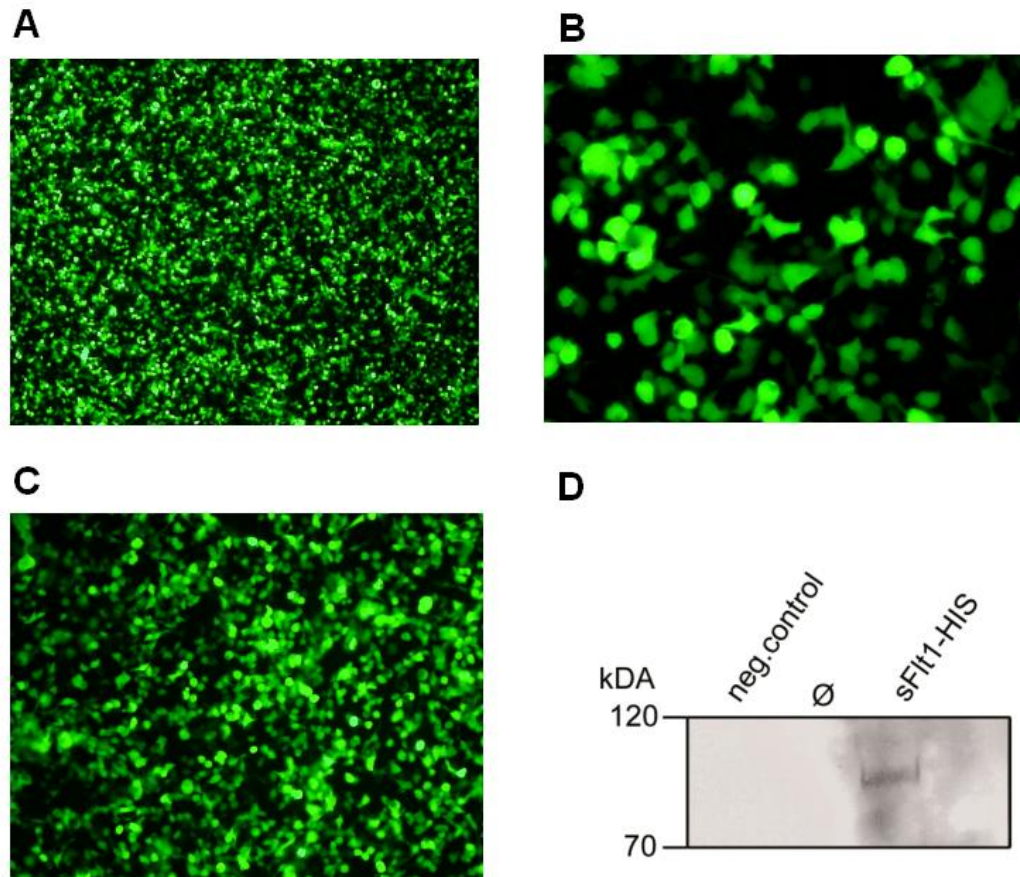


Abbildung 24: In-vitro Expression von sFlt-1 in HEK293 Zellen

(A) Darstellung der mit pIRES-sFlt-1 transfizierten HEK 293 Zellen als Fluoreszenzmikroskopaufnahme in 4-facher Vergrößerung, (B) in Phasenkontrast Darstellung mit 20-facher Vergrößerung. (C) Als Transfektionskontrolle wurde das Plasmid pcGFP genutzt, hier als Fluoreszenzmikroskopaufnahme in 4-facher Vergrößerung. (D) Darstellung eines Westernblots mit pcDNA3.1(+)-sFlt1-HIS mit sichtbarer Bande bei einer Größe von 95 kDa. Die Detektion erfolgte mit einem anti-His Antikörper (1:5000).

4.7 Huvec Migrationsassay

Für den Aktivitätsnachweis des rekombinant exprimierten sFlt1 wurde der in der Literatur klassischerweise angewandte Migrationsassay mit humanen Nabelschnurvenen Endothelzellen (HUVEC) Zellen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach dem unter 3.6 genannten Testverfahren. HUVEC Zellen reagieren sehr sensitiv auf die Anwesenheit von VEGF mit einer aktiven Migration in zellfreie Bereiche. Im Standard Assay werden die Zellen daher bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Ein definierter Spalt wird dann freigeschabt und verschiedene zu testende Substanzen, Wachstumsfaktoren oder deren Inhibitoren, können ins Medium hinzugefügt werden. Anschließend kommt es zu einem Einwachsen der HUVC Zellen in den zellfreien Spalt und dieser wird enger. Die Breite des Spalts wird nach 48 Stunden gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte deutlich sichtbar gemacht werden, dass HUVEC Zellen unter Anwesenheit von VEGF in den Spalt einwachsen und ihn somit verkleinern (Positivkontrolle) (Abb. 25B). In Abwesenheit von VEGF (Negativkontrolle) wuchsen die Zellen nicht in den Spalt (Abb. 25A). Bei Anwesenheit von VEGF und Lucentis® wuchsen weniger Zellen in den Spalt ein, was die hemmende Wirkung von Lucentis® belegt (Abb. 25E).

Um die Aktivität des transgenen sFlt-1 nachzuweisen, zusätzlich jedoch auch die Funktionalität des TetOn Systems im in dieser Arbeit hergestellten SSV9-TetOn-sFlt1 zu demonstrieren, wurde die HUVEC Zellen mit Medium gefüttert, welches von HEK293 Zelllinien stammt, die mit dem Plasmid transfiziert und entweder mit Doxycyclin behandelt wurden oder nicht. Die Gabe von Doxycyclin zum Medium in einer Konzentration von 5µg/ml sollte bei mit dem SSV9-TetOn-sFlt1 Plasmid transfizierten Zellen zu einer Induktion der sFlt-1 Produktion führen, während dies bei transfizierten Zellen ohne Doxycyclin nicht der Fall sein sollte. Die Induktion der sFlt-1 Expression kann somit indirekt mit dem Aktivitätsassay nachgewiesen werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bewirkte die Zugabe von 50 µl Medium von transfizierten und induzierten HEK293 Zellen, dass die Migration der HUVEC Zellen ähnlich stark unterbunden wurde, wie nach Zugabe von 100ng Lucentis® (Abb. 25 C, Abb.26A und B). Im induzierten Stadium betrug die Inhibition der Migration 60%(+/-3%), die Inhibition durch Lucentis® 60%(+/-2%), (Abb. 26A).

Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe von 50 µl Medium von transfizierten und nicht-induzierten HEK293 Zellen, dass die Migration der HUVEC Zellen nicht gehemmt wurde (Abb. 25 D). Hier betrug die Inhibition 18%(+/-3%). Die Hemmung durch Medium der induzierten Zellen war signifikant gegenüber der negativen Kontrolle und auch signifikant stärker als die Hemmung durch nicht-induziertes Medium (Abb. 26A). Dies zeigt deutlich, dass sFlt-1 unter induzierten Bedingungen vom Plasmid exprimiert wurde und biologisch aktiv ist. Da aufgrund fehlender Quantifizierungsmethoden die genaue Menge von sFlt-1 nicht bestimmt werden konnte, kann nur die Aussage getroffen werden, dass sFlt-1 biologisch aktiv ist, jedoch nicht, ob es stärker oder schwächer aktiv ist als rekombinantes Lucentis®.

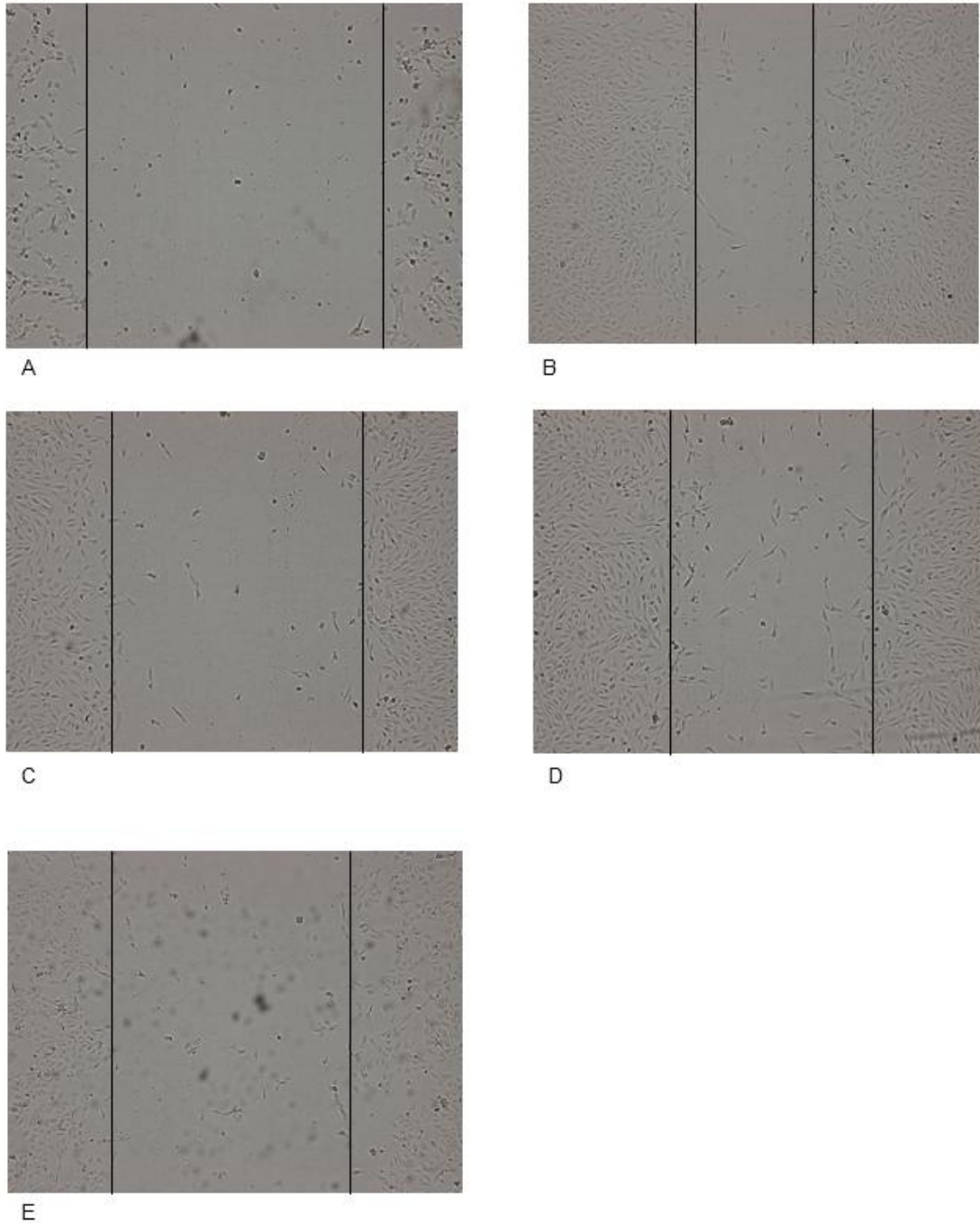
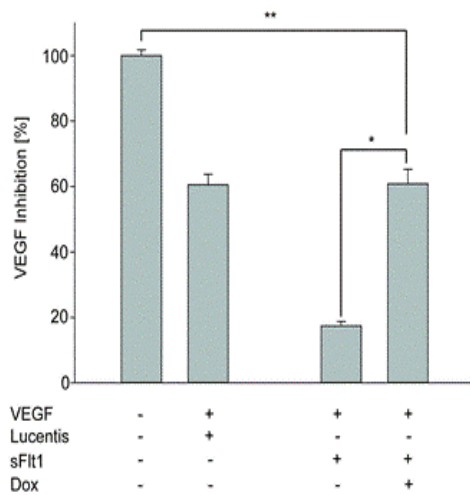


Abbildung 25: HUVEC-Migrationsassay: Einfluss auf das Wachstum der HUVEC-Zellen

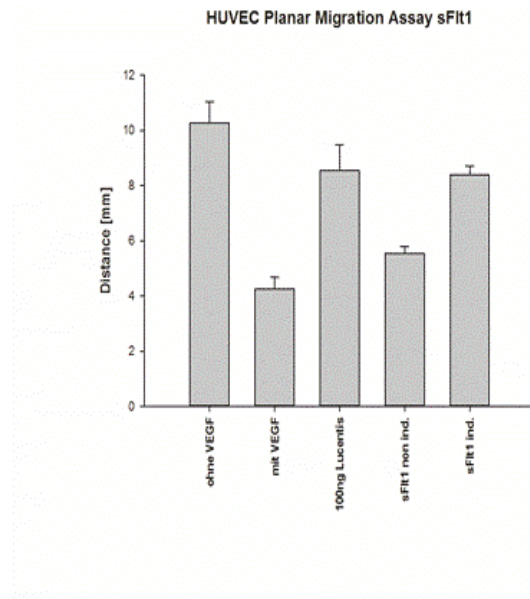
(A) Darstellung des Zellwachstums von HUVEC-Zellen ohne VEGF sowie bei Zugabe von VEGF **(B)**. **(C)** Bei Zugabe von 50 µl Medium von transfizierten und induzierten sFlt-1 HEK293 Zellen zeigt sich ein größerer freigebliebener Spalt, also eine verstärkte Hemmung der Zellmigration. **(D)** Bei Zugabe von 50 µl Medium von transfizierten und nicht-induzierten sFlt-1 HEK293 Zellen zeigte sich keine Hemmung der Zellmigration. **(E)** Darstellung des Zellwachstums der HUVEC-Zellen bei Zugabe von Lucentis®

(schwarze Linien : Grenzen des freigelegten Raumes)

A

* P=0,00508

** P=0,00528

B**Abbildung 26: Darstellung der VEGF-Inhibition**

(A) Darstellung der VEGF Inhibition in % durch Lucentis[®], sFlt-1 im nichtinduzierten Zustand (- Dox) und im induzierten Zustand (+Dox). **(B)** Darstellung der Größe des zellfreien Raumes in Abhängigkeit der verschiedenen anwesenden Substanzen in mm. Der größte zellfreie Raum entsteht ohne VEGF, gefolgt von der Zugabe 100ng Lucentis[®] sowie induziertem sFlt-1. Nicht-induziertes sFlt-1 führte zu einer weniger starken Hemmung des Zellwachstums, d.h. zu einem kleineren zellfreien Raum. Am kleinsten war die Größe des zellfreien Raumes bei Anwesenheit von VEGF.

5 Diskussion

Wir konnten in dieser Arbeit die cDNA des physiologisch vorkommenden anti-VEGF Moleküls sFlt-1 aus humaner kornealer RNA isolieren. Die cDNA wurde in verschiedene Expressionsvektoren mit und ohne Möglichkeit der Expressionskontrolle durch das Tetracyclin-abhängige System TetOn kloniert. Die biologische Aktivität von sFlt-1 ließ sich mittels HUVEC Migrationsassay nachweisen. Die Klonierung in den SSV9 Vektor ist für eine in weiterführenden Studien geplante Herstellung von AAV Vektoren notwendig. Die AAV Vektoren werden zunächst in entsprechenden Mausmodellen in vivo getestet, um zu einem späteren Zeitpunkt beim Menschen eingesetzt zu werden. Die in dieser Arbeit mit dem TetOn System hergestellte regulierbare Expressionskassette für humanes sFlt-1 ist somit die Grundlage für ein neues, alternatives Behandlungssystem für Menschen mit neovaskulären Erkrankungen der Netzhaut.

Langfristig gesehen bietet dieses System eine Alternative zu den bisherigen Standardtherapien bei ophthalmologischen Erkrankungen des Menschen wie diabetischer Retinopathie, Frühgeborenenretinopathie oder altersabhängiger Makuladegeneration. Bedenkt man, dass die altersabhängige Makuladegeneration eine der führenden Ursachen für die Erblindung von Menschen über dem 50. Lebensjahr in Industrieländern ist, und die momentane Standardtherapie der wiederholten intraokularen Injektion von anti-VEGF Molekülen wie Lucentis[®] oder Eylea sehr teuer ist (bis zu 1500 EUR pro Injektion), wird deutlich warum alternative, spezifische und finanzierbare Therapieoptionen so wichtig sind. Da den drei oben genannten Erkrankungen als gemeinsame Ursache eine übermäßige VEGF Konzentration und daraus folgend ein erhöhtes, unkontrolliertes Gefäßwachstum im Auge zu Grunde liegt, ist genau dies der Ansatzpunkt dieser Arbeit. Bislang verfolgt man zwei Strategien um VEGF an der Bindung seines Rezeptors zu hindern. VEGF wird vor seiner Bindung abgefangen oder aber der Rezeptor wird blockiert (Ferrara und Kerbel 2005). Mit der Herstellung des in dieser Arbeit vorgestellten regulierbaren Expressionssystems sind wir in der Lage, VEGF durch die Produktion von löslich und physiologisch vorkommendem sFlt-1 mit hoher Affinität zu binden und somit an seiner gefäßproliferativen Wirkung zu hindern.

Nach aktuellen Leitlinien werden als Standardtherapie für neovaskuläre Erkrankungen des Auges VEGF-Hemmer wie Ranibizumab (Lucentis[®]) oder Bevacizumab (Avastin[®]) in kurzen Zeitintervallen intraokular injiziert (monatlich). Dies ist notwendig,

da die Substanzen eine relativ geringe Halbwertszeit haben und mithilfe dieser Injektionsart ein hoher Wirkspiegel im Glaskörper erzielt werden kann. Um in den subretinalen Raum zu gelangen, müssen die Wirkstoffe vom Glaskörper aus die Membrana limitans interna, die gesamte Neuroretina, das retinale Pigmentepithel (RPE) sowie die Bruch-Membran überwinden (Meyer et al. 2008).

Die unmittelbare Wirkung ruft weniger systemische Nebenwirkungen hervor, da man eine relativ geringe Menge benötigt. Durch den invasiven Eingriff kann es jedoch zu Nebenwirkungen kommen, vorrangig Endophthalmitis, Ablatio retinae oder Uveitis. Auch die Dosis des Wirkstoffes ist limitiert, da nicht unbegrenzt viel Volumen im Glaskörperraum Platz findet.

Da für den Patienten zum Einen das Risiko einer Komplikation erhöht und zum Anderen die Applikationsart unangenehm ist, sowie eine finanzielle Belastung darstellt, ist die Entwicklung eines Systems zur einmaligen Injektion von großem Vorteil.

5.1 Charakteristik von sFlt-1

Wir haben uns entschieden sFlt-1 für die Herstellung eines alternativen Expressionssystems zu nutzen, da es ein physiologisch vorkommendes Molekül ist. Als löslicher Faktor, der durch alternatives Splicen aus der gleichen prä-mRNA entsteht wie der membranständige Rezeptor VEGFR-1, kann es VEGF mit hoher Affinität binden und eine proliferative Wirkung verhindern (Kendall und Thomas 1993). Wir konnten sFlt-1 aus cornealer RNA für weitere Klonierungen isolieren und mittels RT-PCR in cDNA umschreiben. Somit war es nach erfolgreichen Klonierungen in humanen Zelllinien exprimierbar. Vorteilhaft an dieser Art der Herstellung ist, dass für spätere Experimente genau das humane Protein genutzt wird, welches auch physiologisch im Auge vorkommt. Somit ist keine immunogene Wirkung direkt auf sFlt-1 zu erwarten.

Es wurde bestimmt, in welchen Konzentrationen sFlt-1 hemmend auf die mitogene Aktivität von VEGF auf Endothelzellen (HUVEC) wirkt. Die Abnahme der mitogenen Aktivität ist der Beweis für die Funktionalität von sFlt-1.

5.2 Vergleich mit aktuellen therapeutischen Molekülen

Vergleicht man sFlt-1 mit anderen, bisherigen therapeutischen Molekülen ist vor Allem die geringere immunogene Wirkung von sFlt-1 hervorzuheben. Die Herstellung eines ohnehin physiologisch vorkommenden Moleküls in retinalen Zellen ist einfacher als die Herstellung ganzer Antikörper wie zum Beispiel des Immunglobulins Bevacizumab. Das Fehlen eines konstanten Fc-Teils verhindert, dass eine Komplementbindung mit dem gesamten Antikörper eingegangen wird. Dies würde eine stärkere Immunreaktion

auslösen. Wie in Abschnitt 1.7.1 erwähnt konnte in den aktuellen Sicherheitsstudien von Lai et al. und MacLachlan eine lediglich milde immunologische Reaktion nachgewiesen werden die auch eher auf das Kapsid des AAV2 Vektors zielen. Da die immunologischen Reaktionen selbstlimitierend waren, wird die Verwendung eines anderen Vektors als AAV2 nicht notwendig sein (Lai et al. 2012; MacLachlan 2011).

Hinsichtlich der hemmenden Wirkung auf das Gefäßwachstum konnten wir mit dem HUVEC-Migrationsassay sichtbar machen, dass sFlt-1 gleich stark antiproliferativ wirkt wie Lucentis® (Abb.26). Aufgrund fehlender Quantifizierungsmethoden kann die genau benötigte Menge von sFlt-1 nicht bestimmt werden. Nachweisbar ist jedoch, dass sFlt-1 biologisch aktiv ist und die VEGF-abhängige Migration der HUVEC-Zellen effizient hemmt. Eine Aussage über eine stärkere oder schwächere Aktivität als rekombinantes Lucentis® ist bisher nicht möglich.

Es bleibt abzuwarten, wie wirksam sich sFlt-1 in weiteren aktuellen, klinischen Studien zeigt. In verschiedenen Experimenten wurde sFlt-1 bereits mithilfe von AAV kontinuierlich in der Retina exprimiert (Honda et al. 2000; Lai et al. 2005; Gehlbach et al. 2003; Rota et al. 2004) und konnte in laserinduzierten Mausmodellen und im ROP Modell eine Reduktion der neovaskulären Endothelzellen bewirken (Bainbridge et al. 2002; Lai et al. 2002). Basierend auf diesen Studien hat eine australische Forschergruppe einen AAV2 Vektor entwickelt, der sFlt-1 kontinuierlich exprimiert, und diesen am Primatenmodell getestet (Lai et al. 2005). Hierbei konnte ein langfristiger (über 8 Monate) Rückgang an Gefäßneubildungen nachwiesen werden. Ebenfalls zeigten sie und auch MacLachlan in einer Langzeit-Sicherheitsstudie an nicht-humanen Primaten, dass die subretinal applizierten AAV2 Vektoren im Auge verblieben (MacLachlan 2011). Es besteht also kaum Gefahr eine systemische Wirkung hervorzurufen. Nur sehr geringe Mengen wurden im Sehnerv oder Chiasma gefunden, diese riefen jedoch keine Einschränkungen des Verhaltens oder Sehens der Tiere hervor.

5.3 Ein regulierbares Expressionssystem-TetOn

Trotz der im vorherigen Abschnitt beschriebenen positiven Erfolge durch die kontinuierliche Expression von sFlt-1 haben wir in dieser Arbeit die Notwendigkeit einer Regulationsmöglichkeit beachtet. Es ist bekannt, dass eine langzeitige, konstante Hemmung der VEGF Produktion auch negative Folgen hat, welche in 1.5.3 beschrieben wurden. Uda et al. zeigten in ihrer Studie zur Regeneration der Leber nach erfolgter partialer Hepatektomie, dass eine langfristige Expression von sFlt-1 zu einer schlechteren Regeneration der Leber führte, da VEGF auch eine protektive und für Regeneration notwendige Wirkung hat. Somit sollte die Regulationsfähigkeit von sFlt-1 im Auge gewährleistet sein, um die Vorteile der Angiogenese nicht vollständig zu unterbinden (Uda et al. 2013). Mithilfe des TetOn-Systems kann man unter Beobachtung des Patienten die wirksame Dosis einstellen, die nötig ist um die pathologische Neovaskularisation zu stoppen, aber zeitgleich gefährliche Nebeneffekte durch einen permanenten VEGF Mangel vermeiden. Man kann mit einer niedrigfrequenten Expression von sFlt-1 ähnliche Konzentrationen erhalten, wie mit wiederholten Injektionen synthetisch hergestellter Moleküle. Dass das TetOn-System in vivo funktionsfähig ist, zeigten die Versuche mit dem Reportergen Erythropoetin im TetOn System in der Retina von nicht-humanen Primaten (Stieger et al. 2007). Hierbei konnten eindeutig zielgerichtet verschiedene Epo-Konzentrationen erzeugt werden, je nach Regulation durch Doxycyclingabe (siehe Abschnitt 1.7.2.). Es wurden über mehrere Jahre keinerlei immunologische Reaktionen gegenüber dem Reportergen Epo oder dem Transaktivator des TetOn Systems beobachtet.

Einen entscheidenden Vorteil gegenüber allen bisher verwendeten VEGF-Hemmern stellt die Verringerung der Frequenz intravitrealer Injektionen dar. Mit der Regulationsmöglichkeit von sFlt-1 durch das TetOn System haben wir die Möglichkeit eine langfristige Hemmung der Gefäßproliferation zu erreichen, sie gezielt einzusetzen und sie ohne Nebenwirkungen durch wiederholte Injektionen steuerbar zu machen.

5.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt einen neuen Ansatz in der Behandlung neovaskulärer Erkrankungen am Auge auf. Unter Berücksichtigung von Transfer und Regulationssystemen kann die Expression von sFlt-1 im Auge eine zukünftige Behandlungsmethode darstellen. Durch sie würden sich Immunreaktionen, Nebenwirkungen und Kosten sowohl für Patienten als auch für das Gesundheitssystem senken lassen. Es stellt eine körpereigene und sehr effektive Alternative zu bisherigen anti-VEGF Molekülen dar.

Der nächste Schritt, diesem Projekt folgend, ist die Herstellung von AAV-Vektoren und Erprobung in vivo im Mausmodell um Aussagen darüber treffen zu können welche Konzentrationen von Doxycyclin zu einer probaten Produktion von sFlt-1 notwendig sind. Das hergestellte Plasmid SSV9-TetOn-sFlt-1 enthält jeweils am 5' und 3' Ende der Expressionskassette zwei ITR's, die notwendig sind um virale Vektoren herzustellen.

Die in Zukunft am europäischen Referenzlabor für AAV-Produktion INSERM U649 der Universität Nantes, Frankreich hergestellten Vektoren AAV.TetOn-sFlt-1 werden entweder in die Serotypen AAV2 oder 5 inkorporiert, welche Photorezeptoren und RPE transduzieren oder in den Serotypen AAV4, der spezifisch nur das RPE transduziert. Im Rahmen der in vivo Untersuchung soll der Effekt von sFlt-1 in zwei verschiedenen Mausmodellen getestet werden: 1.) bei normalen Mäusen mit choroidaler Neovaskularisation durch eine laser-induzierte Ruptur der Bruch'schen Membran und 2.) im ROP Mausmodell mit retinalen Neovaskularisationen. So soll herausgefunden werden, welcher Vektor besser geeignet ist, sFlt-1 Protein in der Retina zu erzeugen.

Insgesamt zeigt diese Arbeit einen neuen und vorstellbaren Behandlungsansatz für proliferative Retinopathien.

6 Zusammenfassung

Eine vermehrte Freisetzung von VEGF (vascular endothelial growth factor) im Auge führt bei Krankheiten wie der AMD (Altersbedingte Makuladegeneration) oder der DR (Diabetische Retinopathie) zu unkontrolliertem Gefäßwachstum. Wiederholte Injektionen von anti-angiogenen Molekülen wie Lucentis® (Ranibizumab) oder Avastin® (Bevacizumab) stellen die aktuelle Leitlinientherapie dar. Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Gentherapie mit welcher anti-VEGF Moleküle über lange Zeit im Auge produziert werden können. Um dies zu erreichen, wurde die lösliche Form des VEGF-Rezeptors 1 (sFlt1) unter Kontrolle eines Tetrazyclin-induzierbaren TetOn-Promotors in eukaryotischen Zelllinien exprimiert und die biologische Aktivität in zellspezifischen Assays analysiert.

Die sFlt1 cDNA wurde aus der Cornea extrahiert und vervielfältigt um anschließend in einen TetOn Expressionsvektor kloniert zu werden. HEK293 Zellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert und die Expression von sFlt1 mithilfe des Tetrazyclin-Derivats Doxycyclin induziert. Der Überstand mit dem Genprodukt wurde 24 Stunden nach der Expression abgenommen. Mit ihm wurden HUVEC Migrations Assays durchgeführt um die biologische Aktivität zu bestimmen und mit der von Lucentis® zu vergleichen.

sFlt1 wurde erfolgreich hergestellt und von HEK293 freigesetzt. Dies lies sich im Western Blot zeigen. Im HUVEC Migrationsassay zeigte das induzierte sFlt1 eine Reduktion der Zellmigration von 60%(+/- 3%), das nicht-induzierte sFlt1 eine Reduktion von 18% (+/- 1%). Im Vergleich dazu zeigte Lucentis® (100ng) eine Reduktion von 60% (+/- 2%).

Die Expression von sFlt1 kann durch die Anwendung des TetOn-Systems kontrolliert werden. Es produziert ausreichende Mengen an sFlt1 um VEGF im HUVEC Migrationsassay zu inhibieren, vergleichbar mit Lucentis®. Diese Ergebnisse zeigen eine mögliche Gentherapie um VEGF bei Krankheiten wie der DR oder der AMD zu hemmen.

7 Summary

Upregulation of VEGF (vascular endothelial growth factor) in the eye leads to uncontrolled retinal vessel growth in diseases like AMD (age related macula degeneration) or DR (diabetic retinopathy). Repeated injections of anti-angiogenic molecules like Lucentis® (Ranibizumab) or Avastin® (Bevacizumab) are the state of the art treatment for these disorders. The aim of this study was to develop a gene addition therapy, with which anti-VEGF molecules are produced over long time periods in the eye. To achieve this, I expressed the soluble isoform of the VEGF receptor 1 (sFlt1) under the control of the Tetracyclin-inducible TetOn-promotor in eukaryotic cell lines and analyzed the biological activity cell dependent assay.

The sFlt1 cDNA was amplified from corneal extracts and cloned into a TetOn expression vector. HEK293 cells were transfected with these constructs and the expression of sFlt1 was induced with the Tetracyclin-derivate Doxycyclin. The gene-product containing supernatand was collected after 24 hours of expression. HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) migration assays were performed to determine the biological activity of the expressed molecules compared to Lucentis®.

The soluble Flt1 receptor was successfully produced and secreted from HEK293, which was documented on a Western blot. In the HUVEC migration assay, the induced sFlt1 sample showed a reduction of cell migration of 60% (+/-3%) and the non-induced sFlt1 sample a reduction of 18% (+/-1%), compared to Lucentis® (100ng) of 60% (+/-2%).

The expression of sFlt1 can be controlled using the TetOn system, which produces sufficient amounts of sFlt1 to inhibit VEGF in the HUVEC migration assay compared to Lucentis®. These results provide the basis for a gene-addition therapy to inhibit VEGF in pathologies like AMD or DR.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| ϵ | Extinktionskoeffizient |
| aa | Aminoacid |
| AAV | Adeno-assoziiierter Vektor |
| Abb | Abbildung |
| Abk | Abkürzung |
| abs. | absolut |
| Accord | Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes |
| ad | auffüllen auf |
| AK | Antikörper |
| AMD | altersbedingte Makuladegeneration |
| Amp | Ampicilin |
| ANCHOR | Anti-VEGF-Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularisation in AMD |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Arpe 19 | adherent retinal pigmented epithelium |
| BGH | Bovine growth hormone |
| bp | Basenpaare |
| c | Konzentration der absorbierenden Substanz |
| CATT | Comparison of AMD Treatment Trials |
| CHO | Chinese hamster ovary |
| cm ² | Quadratzentimeter |
| CMV | Cytomegalievirus Promoter |
| CNV | choroidale Neovaskularisation |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CTGF | connective tissue growth factor |
| d | Tage |
| dest. | destilliert |
| DMEM | Dubelcco's modiflicated Eagle medium |

| | |
|----------------|---|
| DMSO | Dimethyl-Sulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Freie Desoxyribonukleotide |
| Dox | Doxycyclin |
| DR | diabetische Retinopathie |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Extinktion |
| ECL | Enhanced chemiluminescence |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiaminetetraessigsäure |
| EMA | Europäische Arzneimittel-Agentur |
| EPO | Erythropoetin |
| et al. | und andere |
| F(ab) | fragment antigen binding |
| FBS,FCS,FKS | fetal bovine serum , fetal calf serum,fetales Kälberserum |
| Fc | fragment crystallizabel |
| FDA | Food and Drug Administration |
| Flk-1 | fetal liver kinase receptor |
| Flt-1 | fms-related tyrosine kinase 1 |
| Flt-4 | fms-related tyrosin kinase 4 |
| g | Gramm |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| h | Stunde |
| H | schwere Kette |
| HCl | Salzsäure |
| HEK 293 | Human Embryonic Kidney cells |
| HeLa-Zellen | Henrietta Lacks-Zellen |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure) |
| HIF-1 | Hypoxia-inducible Factor |
| hrGFP | humanized recombinand green fluorescent protein |
| HUVEC | Human Umbilical Vein Endothelial Cells |
| I _o | Intensität des eintretenden |

| | |
|--------|--|
| | Lichtstrahls |
| I | Intensität des nach Durchgang durch die Probe austretenden Lichtes |
| ICAM-1 | Adhäsionsmolekül |
| Ig | Immunglobulin |
| IGF-1 | insulin-like growth factor 1 |
| IgG1 | Immunglobulin G1 |
| IRES | internal ribosomal entry site |
| ITR | Inverted terminal repeats |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| KDR | kinase insert domain receptor |
| L | leichte Kette |
| L+H | pIRES-anti-VEGF mit leichter Kette + pIRES-anti-VEGF mit schwerer Kette |
| LB | Luria Broth |
| LDL | Low-Density Lipoprotein |
| LH | pIRES-anti-VEGF mit leichter und schwerer Kette |
| Lk | Leader Sequenz |
| m | Meter |
| M | Molar |
| m- | milli |
| mA | Milliampere |
| MARINA | Minimally Classic/Occult trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD |
| MCS | Multiple cloning site |
| mg | Milligramm |
| min. | Minute |
| ml | Milliliter |
| mmHg | Millimeter Hydrargyrum |
| M-PER | Mammalian Protein Extraction Reagent |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |

| | |
|------------------------|---|
| Ms | Millisekunde |
| n- | nano |
| Na | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NRP-1 | Neuropilin-1 |
| NRP-2 | Neuropilin-2 |
| ODx | optische Dichte bei Wellenlänge x nm |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | phosphate buffer sulfate, |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDGF-B | Platelet Derived Growth Factor B |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PIGF | plazenta growth factor |
| prä-mRNA, pre-mRNA | precursor messenger ribonucleic acid |
| qsq | auffüllen |
| RNV | retinale Neovaskularisation |
| ROP | retinopathy of prematurity (Frühgeborenenretinopathie) |
| RPE | Retinales Pigmentepithel |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase PCR |
| S | Disulfidbrücke |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| sec. | Sekunden |
| sFlt-1 | soluble fms-like tyrosine kinase-1 |
| SV40pA | Polyadenylierungssignal SV40 |
| TBS | Tris-Salz-Puffer |
| Tet-On, Tet-Off system | Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin |
| Te-Puffer | Tris-EDTA-Puffer |
| TGF-β1 | Transforming Growth Factor β1 |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |

| | |
|--------------|---|
| Tween20 | Polysorbat 20 |
| U | Unit (Enzymeinheit) |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| V.I.S.I.O.N. | VEGF-Inhibition Study in Ocular Neovascularization |
| v/v | volume/ volume |
| w/v | weight/volume |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| VEGF-R | VEGF-Rezeptor |
| VPF | vascular permeability factor |
| VRP | VEGF-related protein |

8.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schema der VEGF Rezeptoren und ihrer Liganden | 10 |
| Abbildung 2: Der molekulare Aufbau des Aptamers Pegaptanib | 11 |
| Abbildung 3: Der molekulare Aufbau von Bevacizumab | 12 |
| Abbildung 4: Der molekulare Aufbau des Fab-Fragments Ranibizumab mit schwerer und leichter Kette..... | 13 |
| Abbildung 5: Der molekulare Aufbau von Aflibercept..... | 14 |
| Abbildung 6: Schema der Struktur des VEGFR-1 und sFlt-1 | 16 |
| Abbildung 7: Design des Regulationssystems Tet-On..... | 22 |
| Abbildung 8: Zeitlicher Zusammenhang der Epo-Konzentration nach subretinaler Injektion von AAV2/TetOn-Epo | 23 |
| Abbildung 9: pCR2.1-Topo 3931bp (..... | 31 |
| Abbildung 10: pIRES-hr-GFP1a | 32 |
| Abbildung 11: pcDNA3.1(+) (..... | 33 |
| Abbildung 12: pcDNA3.1(+)-sFlt1-HIS (7618bp)..... | 33 |
| Abbildung 13: SSV9-TetOn-Epo (..... | 34 |
| Abbildung 14: peGFP-N1 | 35 |
| Abbildung 15: Prinzip der RT-PCR zur Herstellung von cDNA aus mRNA | 39 |
| Abbildung 16: Ablauf der Klonierung | 41 |
| Abbildung 17: Semi Dry-Blot Aufbau | 49 |
| Abbildung 18: Detektionsprinzip mit spezifischen Antikörpern..... | 50 |
| Abbildung 19: Herstellung der sFlt-1 mRNA | 52 |
| Abbildung 20: Zweiteilige Klonierung von sFlt-1 | 54 |
| Abbildung 21: Klonierung von pIRES-hrGFP1-sFlt-1 | 56 |
| Abbildung 22: Klonierung von pcDNA3.sFlt-1 | 57 |
| Abbildung 23: Klonierung von SSV9-Tet-On-sFlt-1 | 59 |
| Abbildung 24: In-vitro Expression von sFlt-1 in HEK293 Zellen..... | 61 |
| Abbildung 25: HUVEC-Migrationsassay: Einfluss auf das Wachstum der HUVEC-Zellen | 64 |
| Abbildung 26: Darstellung der VEGF-Inhibition | 65 |

8.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: VEGF Isoformen | 8 |
| Tabelle 2: Vergleich der aktuell zugelassenen Medikamente | 15 |
| Tabelle 3: Isoformen von sFlt-1 nach NCBI | 17 |
| Tabelle 4: Aktuelle Studien zur kontinuierlichen sFlt-1 Expression | 20 |

9 Literaturverzeichnis

- Achen**, M. G.; Jeltsch, M.; Kukk, E.; Makinen, T.; Vitali, A.; Wilks, A. F. et al. (1998): Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (2), S. 548–553.
- Adamis**, A. P.; Miller, J. W.; Bernal, M. T.; D'Amico, D. J.; Folkman, J.; Yeo, T. K.; Yeo, K. T. (1994): Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. In: *Am J Ophthalmol* 118 (4), S. 445–450.
- Ambati**, Balamurali K.; Nozaki, Miho; Singh, Nirbhay; Takeda, Atsunobu; Jani, Pooja D.; Suthar, Tushar et al. (2006): Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. In: *Nature* 443 (7114), S. 993–997.
- Anna**: 024-010 S1 Augenärztliche Screening-Untersuchung von Frühgeborenen 11-2007 11-2012.{Stieger 2009 #3}
- Apex CoVantage LLC.**: classification of retinopathia prematorum.
- Baffert**, Fabienne; Le, Tom; Sennino, Barbara; Thurston, Gavin; Kuo, Calvin J.; Hu-Lowe, Dana; McDonald, Donald M. (2006): Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 (2), S. H547-59.
- Bagley** RG, Kurtzberg L, Weber W, Nguyen TH, Roth S, Krumbholz R, Yao M, Richards B, (2011): sFLT01: a novel fusion protein with antiangiogenic activity. In: *Mol Cancer Ther.* 2011 Mar;10(3):404-15.
- Bainbridge**, J. W. B.; Mistry, A.; Alwis, M. de; Paleolog, E.; Baker, A.; Thrasher, A. J.; Ali, R. R. (2002): Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. In: *Gene Ther* 9 (5), S. 320–326.
- Bashshur**, Ziad F.; Bazarbachi, Ali; Schakal, Alexandre; Haddad, Zeina A.; El Haibi, Christelle P.; Nouredin, Baha' N. (2006): Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. In: *Am J Ophthalmol* 142 (1), S. 1–9.
- Bennett**, J.; Maguire, A. M. (2000): Gene therapy for ocular disease. In: *Mol Ther* 1 (6), S. 501–505.
- Bennett**, Jean (2006): Commentary: an eye for eye gene therapy. In: *Hum Gene Ther* 17 (2), S. 177–179.
- Bressler**, N. M.; Bressler, S. B. (2000): Photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne): impact on ophthalmology and visual sciences. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (3), S. 624–628.
- Brown**, David M.; Kaiser, Peter K.; Michels, Mark; Soubrane, Gisele; Heier, Jeffrey S.; Kim, Robert Y. et al. (2006): Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. In: *N Engl J Med* 355 (14), S. 1432–1444.
- Campochiaro**, P. A. (2000): Retinal and choroidal neovascularization. In: *J Cell Physiol* 184 (3), S. 301–310.
- Campochiaro**, Peter A. (2007): Gene therapy for ocular neovascularization. In: *Curr Gene Ther* 7 (1), S. 25–33.

- Cebe Suarez**, S.; Pieren, M.; Cariolato, L.; Arn, S.; Hoffmann, U.; Bogucki, A. et al. (2006): A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. In: *Cell Mol Life Sci* 63 (17), S. 2067–2077.
- Chappelow**, Aimee V.; Kaiser, Peter K. (2008): Neovascular age-related macular degeneration: potential therapies. In: *Drugs* 68 (8), S. 1029–1036.
- Chawla**, D.; Agarwal, R.; Deorari, A.; Paul, V. K.; Chandra, P.; Azad, R. V. (2010): Retinopathy of Prematurity. In: *Indian J Pediatr*.
- Chew**, Emily Y.; Ambrosius, Walter T.; Davis, Matthew D.; Danis, Ronald P.; Gangaputra, Sapna; Greven, Craig M. et al. (2010): Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. In: *N Engl J Med* 363 (3), S. 233–244.
- Clark**, D. E.; Smith, S. K.; He, Y.; Day, K. A.; Licence, D. R.; Corps, A. N. et al. (1998): A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. In: *Biol Reprod* 59 (6), S. 1540–1548.
- Colquitt**, J. L.; Jones, J.; Tan, S. C.; Takeda, A.; Clegg, A. J.; Price, A. (2008): Ranibizumab and pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration: a systematic review and economic evaluation. In: *Health Technol Assess* 12 (16), S. iii-iv, ix-201.
- Coulon**, Cathy; Georgiadou, Maria; Roncal, Carmen; Bock, Katrien de; Langenberg, Tobias; Carmeliet, Peter (2010): From vessel sprouting to normalization: role of the prolyl hydroxylase domain protein/hypoxia-inducible factor oxygen-sensing machinery. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (12), S. 2331–2336.
- Dowlati**, Afshin (2010): Hunting and trapping the vascular endothelial growth factor. In: *J Clin Oncol* 28 (2), S. 185–187.
- Drolet**, D. W.; Nelson, J.; Tucker, C. E.; Zack, P. M.; Nixon, K.; Bolin, R. et al. (2000): Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys. In: *Pharm Res* 17 (12), S. 1503–1510.
- Dunn**, K. C.; Aotaki-Keen, A. E.; Putkey, F. R.; Hjelmeland, L. M. (1996): ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. In: *Exp Eye Res* 62 (2), S. 155–169.
- Ferrara**, N.; Carver-Moore, K.; Chen, H.; Dowd, M.; Lu, L.; O'Shea, K. S. et al. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. In: *Nature* 380 (6573), S. 439–442.
- Ferrara**, N.; Henzel, W. J. (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 161 (2), S. 851–858.
- Ferrara**, Napoleone; Kerbel, Robert S. (2005): Angiogenesis as a therapeutic target. In: *Nature* 438 (7070), S. 967–974.
- Finnerty**, H.; Kelleher, K.; Morris, G. E.; Bean, K.; Merberg, D. M.; Kriz, R. et al. (1993): Molecular cloning of murine FLT and FLT4. In: *Oncogene* 8 (8), S. 2293–2298.
- Folkman**, J.; D'Amore, P. A. (1996): Blood vessel formation: what is its molecular basis? In: *Cell* 87 (7), S. 1153–1155.
- Folkman**, J.; Merler, E.; Abernathy, C.; Williams, G. (1971): Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. In: *J Exp Med* 133 (2), S. 275–288.

Fong, G. H.; Rossant, J.; Gertsenstein, M.; Breitman, M. L. (1995): Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. In: *Nature* 376 (6535), S. 66–70.

Franz Grehn : Augenheilkunde, 30 Auflage Heidelberg 2008 S. 217-222.

Friling, R.; Yassur, Y.; Levy, R.; Kost, J.; Schwartz, B.; Mikhailowsky, R.; Lamprecht, S. A. (1996): A role of transforming growth factor-beta 1 in the control of corneal neovascularization. In: *In Vivo* 10 (1), S. 59–64.

Fruttiger, Marcus (2002): Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (2), S. 522–527.

Fruttiger, Marcus (2007): Development of the retinal vasculature. In: *Angiogenesis* 10 (2), S. 77–88.

Gehlbach, Peter; Demetriades, Anna Maria; Yamamoto, Satoru; Deering, Tye; Xiao, Wei Hong; Duh, Elia J. et al. (2003): Periocular gene transfer of sFlt-1 suppresses ocular neovascularization and vascular endothelial growth factor-induced breakdown of the blood-retinal barrier. In: *Hum Gene Ther* 14 (2), S. 129–141.

Gerhardt, Holger; Betsholtz, Christer (2003): Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. In: *Cell Tissue Res* 314 (1), S. 15–23.

Glaser, B. M.; D'Amore, P. A.; Lutty, G. A.; Fenselau, A. H.; Michels, R. G.; Patz, A. (1980): Chemical mediators of intraocular neovascularization. In: *Trans Ophthalmol Soc U K* 100 (3), S. 369–373.

Gossen, M.; Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (12), S. 5547–5551.

Gossen, M.; Freundlieb, S.; Bender, G.; Muller, G.; Hillen, W.; Bujard, H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. In: *Science* 268 (5218), S. 1766–1769.

Goverdhan, S.; Puntel, M.; Xiong, W.; Zirger, J. M.; Barcia, C.; Curtin, J. F. et al. (2005): Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. In: *Mol Ther* 12 (2), S. 189–211.

Gragoudas, Evangelos S.; Adamis, Anthony P.; Cunningham, Emmett T., JR; Feinsod, Matthew; Guyer, David R. (2004): Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. In: *N Engl J Med* 351 (27), S. 2805–2816.

Grehn, Franz (2008): Augenheilkunde. Mit 20 Tabellen. 30. Aufl. Heidelberg: Springer.

Grunwald, J. E. (1998): Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. In: *Am J Ophthalmol* 125 (5), S. 731–732.

Hammes, H. P. (2011): Diabetic retinopathy and maculopathy. In: *Internist (Berl)*.

Harrell, Sallie Nash; Brandon, Debra Huffman (2007): Retinopathy of prematurity: the disease process, classifications, screening, treatment, and outcomes. In: *Neonatal Netw* 26 (6), S. 371–378.

Hernandez-Pastor, Luis Javier; Ortega, Ana; Garcia-Layana, Alfredo; Giraldez, Joaquin (2008): Cost-effectiveness of ranibizumab compared with photodynamic treatment of neovascular age-related macular degeneration. In: *Clin Ther* 30 (12), S. 2436–2451.

Heydarian, M.; McCaffrey, T.; Florea, L.; Yang, Z.; Ross, M. M.; Zhou, W.; Maynard, S. E. (2009): Novel splice variants of sFlt1 are upregulated in preeclampsia. In: *Placenta* 30 (3), S. 250–255.

Hirschi, K. K.; Rohovsky, S. A.; D'Amore, P. A. (1998): PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. In: *J Cell Biol* 141 (3), S. 805–814.

Hochholzer, Willibald; Reichlin, Tobias; Stelzig, Claudia; Hochholzer, Kirsten; Meissner, Julia; Breidthardt, Tobias et al. (2011): Impact of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor serum levels for risk stratification and early diagnosis in patients with suspected acute myocardial infarction. In: *Eur Heart J* 32 (3), S. 326–335.

Holash, Jocelyn; Davis, Sam; Papadopoulos, Nick; Croll, Susan D.; Ho, Lillian; Russell, Michelle et al. (2002): VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (17), S. 11393–11398.

Holmes, Katherine; Roberts, Owain LI; Thomas, Angharad M.; Cross, Michael J. (2007): Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. In: *Cell Signal* 19 (10), S. 2003–2012.

Holz, Frank G.; Pauleikhoff, Daniel; Klein, Ronald; Bird, Alan C. (2004): Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. In: *Am J Ophthalmol* 137 (3), S. 504–510.

Honda, M.; Sakamoto, T.; Ishibashi, T.; Inomata, H.; Ueno, H. (2000): Experimental subretinal neovascularization is inhibited by adenovirus-mediated soluble VEGF/flt-1 receptor gene transfection: a role of VEGF and possible treatment for SRN in age-related macular degeneration. In: *Gene Ther* 7 (11), S. 978–985.

Houck, K. A.; Ferrara, N.; Winer, J.; Cachianes, G.; Li, B.; Leung, D. W. (1991): The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. In: *Mol Endocrinol* 5 (12), S. 1806–1814.

Hughes, S.; Yang, H.; Chan-Ling, T. (2000): Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 (5), S. 1217–1228.

Hurwitz, Herbert; Fehrenbacher, Louis; Novotny, William; Cartwright, Thomas; Hainsworth, John; Heim, William et al. (2004): Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. In: *N Engl J Med* 350 (23), S. 2335–2342.

Igarashi, Tsutomu; Miyake, Koichi; Masuda, Ikuya; Takahashi, Hiroshi; Shimada, Takashi (2010): Adeno-associated vector (type 8)-mediated expression of soluble Flt-1 efficiently inhibits neovascularization in a murine choroidal neovascularization model. In: *Hum Gene Ther* 21 (5), S. 631–637.

Jacobson, Samuel G.; Acland, Gregory M.; Aguirre, Gustavo D.; Aleman, Tomas S.; Schwartz, Sharon B.; Cideciyan, Artur V. et al. (2006): Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. In: *Mol Ther* 13 (6), S. 1074–1084.

Jager, Rama D.; Mieler, William F.; Miller, Joan W. (2008): Age-related macular degeneration. In: *N Engl J Med* 358 (24), S. 2606–2617.

Jandeck, C.; Kellner, U.; Lorenz, B.; Seiberth, V. (2008): Guidelines for ophthalmological screening of premature infants in Germany. In: *Klin Monbl Augenheilkd* 225 (2), S. 123–130.

- Jewell**, U. R.; Gassmann, M. (2001): Mammalian gene expression in hypoxic conditions. In: *Zoology (Jena)* 104 (3-4), S. 192–197.
- Joussen**, A. M.; Murata, T.; Tsujikawa, A.; Kirchhof, B.; Bursell, S. E.; Adamis, A. P. (2001): Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. In: *Am J Pathol* 158 (1), S. 147–152.
- Kaipainen**, A.; Korhonen, J.; Mustonen, T.; van Hinsbergh, V. W.; Fang, G. H.; Dumont, D. et al. (1995): Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (8), S. 3566–3570.
- Kamba**, Tomomi; Tam, Betty Y. Y.; Hashizume, Hiroya; Haskell, Amy; Sennino, Barbara; Mancuso, Michael R. et al. (2006): VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 (2), S. H560-76.
- Kaza**, Elisabeth; Ablasser, Klemens; Poutias, Dimitrios; Griffiths, Eric R.; Saad, Fawzy A.; Hofstaetter, Jochen G. et al. (2011): Up-regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 prevents angiogenesis in hypertrophied myocardium. In: *Cardiovasc Res* 89 (2), S. 410–418.
- Kelly**, D. J.; Chulay, J. D.; Mikesell, P.; Friedlander, A. M. (1992): Serum concentrations of penicillin, doxycycline, and ciprofloxacin during prolonged therapy in rhesus monkeys. In: *J Infect Dis* 166 (5), S. 1184–1187.
- Kendall**, R. L.; Thomas, K. A. (1993): Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (22), S. 10705–10709.
- Lai**, Chooi-May; Shen, Wei-Yong; Brankov, Meliha; Lai, Yvonne K. Y.; Barnett, Nigel L.; Lee, Shu-Yen et al. (2005): Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. In: *Mol Ther* 12 (4), S. 659–668.
- Lai**, C-M; Estcourt, M. J.; Himbeck, R. P.; Lee, S-Y; Yew-San Yeo, I.; Luu, C. et al. (2012): Preclinical safety evaluation of subretinal AAV2.sFlt-1 in non-human primates. In: *Gene Ther* 19 (10), S. 999–1009.
- Lai**, Y. K. Y.; Shen, W. Y.; Brankov, M.; Lai, C. M.; Constable, I. J.; Rakoczy, P. E. (2002): Potential long-term inhibition of ocular neovascularisation by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy. In: *Gene Ther* 9 (12), S. 804–813.
- Le Bec**, C.; Douar, A. M. (2006): Gene therapy progress and prospects--vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. In: *Gene Ther* 13 (10), S. 805–813.
- Lebherz**, Corinna; Maguire, Albert; Tang, Waixing; Bennett, Jean; Wilson, James M. (2008): Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. In: *J Gene Med* 10 (4), S. 375–382.
- Lei**, J.; Jiang, A.; Pei, D. (1998): Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. In: *Biochim Biophys Acta* 1443 (3), S. 400–406.
- Leung**, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N. (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. In: *Science* 246 (4935), S. 1306–1309.
- Lockhart**, A. Craig; Rothenberg, Mace L.; Dupont, Jakob; Cooper, Wendy; Chevalier, Paul; Sternas, Lars et al. (2010): Phase I study of intravenous vascular endothelial

growth factor trap, aflibercept, in patients with advanced solid tumors. In: *J Clin Oncol* 28 (2), S. 207–214.

Lukason, M; Du Fresne, E; Rubin, H; Pechan, P (2011): Inhibition of choroidal neovascularisation in a nonhuman primate model by intravitreal administration of an AAV2 vector expressing a novel anti-VEGF molecule. In: *MolTher.* Feb;19(2):260-5

MacLachlan, T; Lukason, M; Collins, M.; Munger, R (2011) : Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- A gene therapy for age-related macular degeneration. In: *MolTher.* vol.19 no.2, S. 326-334

Martin, Daniel F.; Maguire, Maureen G.; Ying, Gui-shuang; Grunwald, Juan E.; Fine, Stuart L.; Jaffe, Glenn J. (2011): Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. In: *N Engl J Med* 364 (20), S. 1897–1908.

Mateus, Julio; Bytautienė, Egle; Lu, Fangxian; Tamayo, Esther H.; Betancourt, Ancizar; Hankins, Gary D. V. et al. (2011): Endothelial growth factor therapy improves preeclampsia-like manifestations in a murine model induced by overexpression of sVEGFR-1. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301 (5), S. H1781-7.

Maynard, Sharon E.; Min, Jiang-Yong; Merchan, Jaime; Lim, Kee-Hak; Li, Jianyi; Mondal, Susanta et al. (2003): Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. In: *J Clin Invest* 111 (5), S. 649–658.

Meyer, C. H.; Holz, F. G. (2011): Preclinical aspects of anti-VEGF agents for the treatment of wet AMD: ranibizumab and bevacizumab. In: *Eye (Lond)*.

Meyer, C. H.; Ziemssen, F.; Heimann, H. (2008): Intravitreal injection. Monitoring to avoid postoperative complications. In: *Ophthalmologie* 105 (2), S. 143-55, 157.

Meyer, M.; Clauss, M.; Lepple-Wienhues, A.; Waltenberger, J.; Augustin, H. G.; Ziche, M. et al. (1999): A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. In: *EMBO J* 18 (2), S. 363–374.

Michaelson, I. C. (1948): Vascular morphogenesis in the retina of the cat. In: *J Anat* 82 (Pt 3), S. 167-174.4.

Mitchell, P.; Korobelnik, J-F; Lanzetta, P.; Holz, F. G.; Prunte, C.; Schmidt-Erfurth, U. et al. (2010): Ranibizumab (Lucentis) in neovascular age-related macular degeneration: evidence from clinical trials. In: *Br J Ophthalmol* 94 (1), S. 2–13.

Moserle, L.; Amadori, A.; Indraccolo, S. (2009): The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy. In: *Curr Mol Med* 9 (8), S. 935–941.

Ng, Eugene W. M.; Shima, David T.; Calias, Perry; Cunningham, Emmett T., JR; Guyer, David R.; Adamis, Anthony P. (2006): Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. In: *Nat Rev Drug Discov* 5 (2), S. 123–132.

Oberacher-Velten, I. M.; Helbig, H. (2010): VEGF antibodies as therapy for retinopathy of prematurity. In: *Klin Monbl Augenheilkd* 227 (9), S. 694–700.

Olsson, Anna-Karin; Dimberg, Anna; Kreuger, Johan; Claesson-Welsh, Lena (2006): VEGF receptor signalling - in control of vascular function. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (5), S. 359–371.

Pagliarini, S.; Piguet, B.; Ffytche, T. J.; Bird, A. C. (1995): Foveal involvement and lack of visual recovery in APMPE associated with uncommon features. In: *Eye (Lond)* 9 (Pt 1), S. 42–47.

Pajusola, K.; Aprelikova, O.; Korhonen, J.; Kaipainen, A.; Pertovaara, L.; Alitalo, R.; Alitalo, K. (1992): FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like

loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. In: *Cancer Res* 52 (20), S. 5738–5743.

Patan, S.; Alvarez, M. J.; Schittny, J. C.; Burri, P. H. (1992): Intussusceptive microvascular growth: a common alternative to capillary sprouting. In: *Arch Histol Cytol* 55, S. 65–75.

Patz, A. (1980): Studies on retinal neovascularization. Friedenwald Lecture. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 (10), S. 1133–1138.

Pechan, P.; Rubin, H.; Lukason, M.; Ardinger, J.; DuFresne, E.; Hauswirth, W. W. et al. (2009): Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. In: *Gene Ther* 16 (1), S. 10–16.

Plate, K. H.; Breier, G.; Weich, H. A.; Risau, W. (1992): Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. In: *Nature* 359 (6398), S. 845–848.

Poltorak, Z.; Cohen, T.; Sivan, R.; Kandelis, Y.; Spira, G.; Vlodavsky, I. et al. (1997): VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. In: *J Biol Chem* 272 (11), S. 7151–7158.

Quinn, Graham E.; Gilbert, Clare; Darlow, Brian A.; Zin, Andrea (2010): Retinopathy of prematurity: an epidemic in the making. In: *Chin Med J (Engl)* 123 (20), S. 2929–2937.

Quinn, T. P.; Peters, K. G.; Vries, C. de; Ferrara, N.; Williams, L. T. (1993): Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (16), S. 7533–7537.

Ratnarajan, G.; Mellington, F.; Saldanha, M.; de Silva, SR; Benjamin, L. (2011): Long-term visual and retinopathy outcomes in a predominately type 2 diabetic patient population undergoing early vitrectomy and endolaser for severe vitreous haemorrhage. In: *Eye (Lond)*.

Rehn, Matilda; Olsson, Andre; Reckzeh, Kristian; Diffner, Eva; Carmeliet, Peter; Landberg, Goran; Cammenga, Jorg (2011): Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine hematopoietic stem cell function in the low-oxygenic niche. In: *Blood* 118 (6), S. 1534–1543.

Ribatti, D.; Nico, B.; Crivellato, E.; Roccaro, A. M.; Vacca, A. (2007): The history of the angiogenic switch concept. In: *Leukemia* 21 (1), S. 44–52.

Risau, W. (1995): Differentiation of endothelium. In: *FASEB J* 9 (10), S. 926–933.

Robinson, P. S.; Goochee, C. F. (1991): Kidney-specific enzyme expression by human kidney cell lines generated through oncogene transfection. In: *J Cell Physiol* 148 (1), S. 54–59.

Rolfo, Alessandro; Attini, Rossella; Nuzzo, Anna M.; Piazzese, Annalisa; Parisi, Silvia; Ferraresi, Martina et al. (2013): Chronic kidney disease may be differentially diagnosed from preeclampsia by serum biomarkers. In: *Kidney Int* 83 (1), S. 177–181.

Rosenfeld, Philip J.; Brown, David M.; Heier, Jeffrey S.; Boyer, David S.; Kaiser, Peter K.; Chung, Carol Y.; Kim, Robert Y. (2006): Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. In: *N Engl J Med* 355 (14), S. 1419–1431.

Rota, Rossella; Riccioni, Teresa; Zaccarini, Marco; Lamartina, Stefania; Gallo, Anna Del; Fusco, Angelo et al. (2004): Marked inhibition of retinal neovascularization in rats following soluble-flt-1 gene transfer. In: *J Gene Med* 6 (9), S. 992–1002.

Saint-Geniez, Magali; Maharaj, Arindal S. R.; Walshe, Tony E.; Tucker, Budd A.; Sekiyama, Eiichi; Kurihara, Tomoki et al. (2008): Endogenous VEGF is required for

visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. In: *PLoS One* 3 (11), S. e3554.

Scholl, Hendrik P. N.; Fleckenstein, Monika; Fritsche, Lars G.; Schmitz-Valckenberg, Steffen; Gobel, Arno; Adrion, Christine et al. (2009): CFH, C3 and ARMS2 are significant risk loci for susceptibility but not for disease progression of geographic atrophy due to AMD. In: *PLoS One* 4 (10), S. e7418.

Semenza, G. L. (2000): HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. In: *Cancer Metastasis Rev* 19 (1-2), S. 59–65.

Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Harvey, V. S.; Dvorak, H. F. (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. In: *Science* 219 (4587), S. 983–985.

Shalaby, F.; Rossant, J.; Yamaguchi, T. P.; Gertsenstein, M.; Wu, X. F.; Breitman, M. L.; Schuh, A. C. (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. In: *Nature* 376 (6535), S. 62–66.

Shibuya, M.; Yamaguchi, S.; Yamane, A.; Ikeda, T.; Tojo, A.; Matsushime, H.; Sato, M. (1990): Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. In: *Oncogene* 5 (4), S. 519–524.

Shiraga, F.; Takasu, I.; Shiragami, C. (1998): Treatment options in subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. In: *Semin Ophthalmol* 13 (1), S. 31–39.

Shweiki, D.; Itin, A.; Soffer, D.; Keshet, E. (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. In: *Nature* 359 (6398), S. 843–845.

Singerman, L. J.; Masonson, H.; Patel, M.; Adamis, A. P.; Buggage, R.; Cunningham, E. et al. (2008): Pegaptanib sodium for neovascular age-related macular degeneration: third-year safety results of the VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularisation (VISION) trial. In: *Br J Ophthalmol* 92 (12), S. 1606–1611.

Smith, Gordon C. S.; Crossley, Jennifer A.; Aitken, David A.; Jenkins, Nicola; Lyall, Fiona; Cameron, Alan D. et al. (2007): Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. In: *Obstet Gynecol* 109 (6), S. 1316–1324.

Soker, S.; Takashima, S.; Miao, H. Q.; Neufeld, G.; Klagsbrun, M. (1998): Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. In: *Cell* 92 (6), S. 735–745.

Stefansson, Einar (2004): Diabetic retinopathy. In: *N Engl J Med* 350 (24), S. 2525-6; author reply 2525-6.

Stieger, Knut; Le Meur, Guylene; Lasne, Françoise; Weber, Michel; Deschamps, Jack-Yves; Nivard, Delphine et al. (2006): Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. In: *Mol Ther* 13 (5), S. 967–975.

Stieger, K.; Mendes-Madeira, A.; Meur, G. L.; Weber, M.; Deschamps, J-Y; Nivard, D. et al. (2007): Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. In: *Gene Ther* 14 (23), S. 1668–1673.

Stieger, Knut; Belbellaa, Brahim; Le Guiner, Caroline; Moullier, Philippe; Rolling, Fabienne (2009): In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. In: *Adv Drug Deliv Rev* 61 (7-8), S. 527–541.

- Stillman**, Isaac E.; Karumanchi, S. Ananth (2007): The glomerular injury of preeclampsia. In: *J Am Soc Nephrol* 18 (8), S. 2281–2284.
- Subramanian**, M. L.; Abedi, G.; Ness, S.; Ahmed, E.; Fenberg, M.; Daly, M. K. et al. (2010): Bevacizumab vs ranibizumab for age-related macular degeneration: 1-year outcomes of a prospective, double-masked randomised clinical trial. In: *Eye (Lond)* 24 (11), S. 1708–1715.
- Tang**, Jen-Ruey; Karumanchi, S. Ananth; Seedorf, Gregory; Markham, Neil; Abman, Steven H. (2012): Excess soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in amniotic fluid impairs lung growth in rats: linking preeclampsia with bronchopulmonary dysplasia. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302 (1), S. L36–46.
- Terman**, B. I.; Dougher-Vermazen, M.; Carrion, M. E.; Dimitrov, D.; Armellino, D. C.; Gospodarowicz, D.; Bohlen, P. (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. In: *Biochem Biophys Res Commun* 187 (3), S. 1579–1586.
- Thornton**, J.; Edwards, R.; Mitchell, P.; Harrison, R. A.; Buchan, I.; Kelly, S. P. (2005): Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. In: *Eye (Lond)* 19 (9), S. 935–944.
- Tischer**, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, J. C.; Abraham, J. A. (1991): The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. In: *J Biol Chem* 266 (18), S. 11947–11954.
- Tufail**, Adnan; Patel, Praveen J.; Egan, Catherine; Hykin, Philip; da Cruz, Lyndon; Gregor, Zdenek et al. (2010): Bevacizumab for neovascular age related macular degeneration (ABC Trial): multicentre randomised double masked study. In: *BMJ* 340, S. c2459.
- Uda**, Yugo; Hirano, Tadamichi; Son, Gakuhei; Imuro, Yuji; Uyama, Naoki; Yamanaka, Junichi et al. (2013): Angiogenesis is crucial for liver regeneration after partial hepatectomy. In: *Surgery* 153 (1), S. 70–77.
- Vincenti**, V.; Cassano, C.; Rocchi, M.; Persico, G. (1996): Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. In: *Circulation* 93 (8), S. 1493–1495.
- Vries**, C. de; Escobedo, J. A.; Ueno, H.; Houck, K.; Ferrara, N.; Williams, L. T. (1992): The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. In: *Science* 255 (5047), S. 989–991.
- Waltenberger**, J.; Claesson-Welsh, L.; Siegbahn, A.; Shibuya, M.; Heldin, C. H. (1994): Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. In: *J Biol Chem* 269 (43), S. 26988–26995.
- Yang**, Grace S.; Schmidt, Michael; Yan, Ziyang; Lindbloom, Jonathan D.; Harding, Thomas C.; Donahue, Brian A. et al. (2002): Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. In: *J Virol* 76 (15), S. 7651–7660.
- Yu**, Charles Q.; Zhang, Min; Matis, Krisztina I.; Kim, Charles; Rosenblatt, Mark I. (2008): Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 (9), S. 3870–3878.
- Zuluaga**, Maria-Fernanda; Mailhos, Carolina; Robinson, Gregory; Shima, David T.; Gurny, Robert; Lange, Norbert (2007): Synergies of VEGF inhibition and photodynamic therapy in the treatment of age-related macular degeneration. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (4), S. 1767–1772.

10 Publikationsverzeichnis

Die Dissertation wurde in Teilen in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Poster:

Wimmer T, Wagner N, Senger E, Lorenz B, Stieger K „ In-vitro activity of transgenic anti-VEGF molecules“, 2012 ARVO

11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Mich haben während der Arbeit an dieser Dissertation viele unterschiedliche Menschen begleitet und unterstützt. Ihnen Allen möchte ich sagen wie dankbar ich dafür bin...

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr.med. Birgit Lorenz für ihre freundliche und allzeit vorhandene Unterstützung.

Ein besonderes Dankeschön an Prof. Dr.Dr.med. vet. Knut Stieger für die engagierte Betreuung, Vergabe des Themas, dem Interesse am Gelingen der Arbeit sowie die stetige Hilfestellung von nah und fern.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern des Labors für Ophthalmologie danken, insbesondere Annabella Janise und Tobias Wimmer, die mich mit ihrem Wissen und ihrer Hilfe unterstützt haben und mir auch nach besonders anstrengenden Tagen noch ein Lächeln entlocken konnten.

Liebe Jutta Schlegel (auch liebevoll Birne genannt): Danke für all die Ratschläge, positive Energie und die endlosen Gespräche... egal wie lang die Nächte im Labor wurden.

Ein besonders großes Dankeschön gilt meinen Eltern. Dafür, dass sie mir alle Freiheit und Unterstützung der Welt gegeben haben um mich meinen Weg so gehen zu lassen, wie ich es brauchte.

Wer fehlt? Nun, natürlich meine Freunde...die wundervollen Menschen die immer für mich da sind- bedingungslos.

Danke.

